ANALYSE REPETITIVER GENE BEI DER ZUCKMÜCKE CHIRONOMUS TENTANS: DIE MOLEKULARE STRUKTUR CODIERENDER DNA-SEQUENZEN IN NUKLEOLENBILDUNGSORTEN UND BALBIANIRINGEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

ADELHEID DEGELMANN

aus Vordorf

1981

82 52

ANALYSE REPETITIVER GENE BEI DER ZUCKMÜCKE CHIRONOMUS TENTANS: DIE MOLEKULARE STRUKTUR CODIERENDER DNA-SEQUENZEN IN NUKLEOLENBILDUNGSORTEN UND BALBIANIRINGEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

ADELHEID DEGELMANN

aus Vordorf

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 1981

Dekan: Professor Dr. A. Hager

1. Berichterstatter: Professor Dr. C.P. Hollenberg

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Seyffert

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. C.P. Hollenberg, möchte ich an dieser Stelle aufrichtig danken für seine souveräne und immer angenehme Anleitung zu selbständigem Arbeiten. Seine stete Bereitschaft zur Diskussion und die damit verbundenen, ständigen Anregungen und zahlreichen Ratschläge trugen wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit bei. Herr Prof. Dr. C.P. Hollenberg sorgte auch für die finanzielle Grundlage während der letzten Phase dieser Arbeit. Nicht zuletzt dafür bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. W. Beermann bin ich verbunden für fortwährende Förderung meiner Arbeit, Anteilnahme an ihrem Fortgang und viele wichtige Hinweise. Durch ihn vertiefte sich mein Interesse für das einzigartige Phänomen Riesenchromosomen.

Herr Dr. R. Renkawitz führte mich in die Techniken der DNA-Sequenzierung ein. Ihm und Frau Dr. R. Renkawitz-Pohl möchte ich für ihre großzügige Hilfe herzlich danken.

Mein Dank gilt ferner Frau R. Groemke und Frau C. Hollatz für die Ausführung eines Teils der Fotoarbeiten und Herrn Dr. H. Frank für die freundliche Erlaubnis hierfür.

Herrn K. Lamberty danke ich für die Anfertigung der Zeichnungen.

A une faible distance de chaque extrémité, distance égale à peu près à la largeur des nucléoles, le cordon présente brusquement un renflement discoide assez épais. Comme ce renflement est formé, ainsi que nous le verrons plus loin, par une substance différente de celle du cordon, on peut le décrire comme un anneau que le cordon traverse...

E.G. Balbiani, 1881

There are, however, instances of local modifications of chromosome structure where it is hard to escape the conclusion that highly disproportionate changes of activity must be involved. "Puffs" belonging to this category are known under the name of "rings of Balbiani"...
Most characteristic of Balbiani-rings is the peculiar shape of the puffed region as such. Superficially, it looks like a ring of extrachromosomal material... The ring shape, however, is easily understood on the basis of the facts of polyteny... Mutually exclusive development of two or three different Balbiani-rings at least constitutes a striking demonstration of specific changes at single loci correlated to cellular differentiation.

W. Beermann, 1959

I N H A L T

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	5
	Tiere	5
	Cytologisches Material	5
	Bakterienstämme	6
	Medien	6
	Nucleinsäure-Isolierungen	6
	Isolierung von hochmolekularer DNA aus Chironomus tentans	6
	Isolierung von Plasmid-DNA	7
	Schnellpräparation von Plasmid-DNA	9
	Isolierung von RNA aus C. tentans	9
	Jodierung	11
	Reinigung der Restriktionsendonuclease Sau3A	12
	Verdauungen mit Restriktionsendonuclease	13
	Gel-Elektrophoresen	14
	Präparative Trennung von Restriktionsfragmenten über Saccharosegradienten	15
	Transfer-Hybridisierung	16
	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	17
	Behandlung von Vektorplasmiden mit alkalischer Phosphatase	18
	Ligation	18
	Transformation	19
	Kolonie-Hybridisierung	20
	Nick-Translation	21
	Präparation von ^{3}H-cRNA	21
	In situ Hybridisierung	22
	Autoradiographie	23
	DNA-Sequenzierung	24

Seite

III. ERGEBNISSE 25

Teil 1

Die Organisation der ribosomalen Gene von Chironomus tentans 25

Restriktionsanalysen von Genom-DNA und Klonierung der rDNA 25

Restriktionskartierung der rDNA 29

R-Loop-Kartierung und Heteroduplex-analyse der rDNA 32

Ribosomale "single copy"-Sequenzen in der Genom-DNA 36

Vergleich der ribosomalen DNA verschiedener Chironomus-Arten 38

Teil 2

Die Struktur der Balbianiring-Gene von Chironomus tentans 42

Restriktionsanalyse der Genom-DNA 42

Klonierung der Bande MboI-1 45

Hybridisierung von pCtBR1-1 mit Genom-DNA 62

Die Nucleotidsequenz des BR1-Fragmentes in pCtBR1-1 64

Restriktionskartierung von BR-Genen 68

Die repetitive Substruktur der BR-Gene 74

Interspezifische Konservierung von BR-Sequenzen 77

Klonierung eines Genfragmentes von BR2 80

IV. DISKUSSION 83

Die Struktur der ribosomalen Gene von Chironomus tentans 83

Die Struktur der Balbianiring-Gene von Chironomus tentans 89

V. ZUSAMMENFASSUNG 105

VI. LITERATUR 108

I. EINLEITUNG

In den Polytänchromosomen der Chironomiden finden sich zwei Arten von besonders auffälligen Strukturen, die als lokale Anschwellungen das reguläre Querscheibenmuster unterbrechen: die Nukleolen und eine spezielle Art von Puffs, die nach ihrem Entdecker (Balbiani, 1881) benannten Balbianiringe. Sie sind für die Gattung Camptochironomus mit den Arten C. tentans und C. pallidivittatus nach Lage und Struktur eingehend beschrieben worden (vgl. Beermann, 1962). Gemeinsam ist beiden Arten von Funktionsstrukturen das hohe Niveau der RNA-Synthese. Im Gegensatz zu den Nukleolen sind die Balbianiringe jedoch streng gewebespezifisch und kennzeichnen zusammen mit anderen Puffs den Differenzierungszustand eines bestimmten Zelltyps.

Der Ursprung der Nukleolen liegt in allen Organen an den gleichen Chromosomenorten, den sogenannten Nukleolenbildungsorten oder NO (nucleolus organizers). Die NO enthalten die ribosomale DNA (rDNA), die aus einer je nach Organismus wechselnden Anzahl von tandem-repetitiven Einheiten, den ribosomalen Cistren, besteht. Die ribosomalen Cistren sind in allen Eukaryonten ähnlich strukturiert. Sie enthalten die Gene für 2 ribosomale RNA-Spezies, 18S- und 28S-rRNA und 2 Spacer. 18S- und 28S-rRNA werden zusammen mit dem kleineren der beiden Spacer als Teile einer ribosomalen Vorläufer-RNA transkribiert. Aus diesem langen Primärtranskript entstehen durch mehrere nucleolytische Schritte, das sogenannte "Processing", schließlich die beiden Endprodukte, 18S- und 28S-rRNA (vgl. Review von Perry, 1976). Bei Insekten hat das Primärtranskript eine Größe von 38S (Edström und Daneholt, 1967; Greenberg, 1969; Hughes und Kafatos, 1970).

Die ribosomalen Gene von C. tentans sind, wie bei allen Eukaryonten, redundant und verteilen sich auf 2 NO, die bei europäischen Populationen in den Chromosomen II und III liegen. Sättigungshybridisierung der Genom-DNA mit 18S- und 28S-rRNA ergab eine Anzahl von 43 ribosomalen Cistren

pro haploidem Genom (Hollenberg, 1976). Die gleiche Kopienzahl erhielten Gerbi und Crouse (1976) bei einer anderen Mücke, Sciara coprophila. Dies sind die niedrigsten Werte, die bislang bei Eukaryonten gefunden wurden. Drosophila melanogaster z.B. enthält etwa 240 ribosomale Cistren (Tartof, 1979).

Die ribosomalen Gene waren die ersten Eukaryontensequenzen, die mit den jüngst entwickelten Methoden der Gentechnologie isoliert und charakterisiert wurden (Morrow et al., 1974). Dies liegt an ihrer hohen Kopienzahl und an der einfachen Selektierbarkeit der rekombinanten Klone durch Hybridisierung mit der leicht zu gewinnenden, ribosomalen RNA. Die in dieser Arbeit durchgeführte Klonierung ribosomaler Gene von C. tentans war ursprünglich als Testsystem der neuen Methoden der Gentechnologie konzipiert, die dann auf das eigentliche Ziel, die Balbianiringe, angewendet werden sollten. Inzwischen hatte die Analyse klonierter rDNA bei Xenopus laevis (Wellauer et al., 1976) und Drosophila melanogaster (Glover und Hogness, 1977; White und Hogness, 1977, Wellauer und Dawid, 1977; Pellegrini et al., 1977) unerwartete Resultate erbracht, nämlich eine extensive Längenheterogenität der ribosomalen Cistren. Bei Xenopus basiert diese Heterogenität auf unterschiedlichen Längen des untranskribierten Spacers, bei Drosophila auf die Einlagerung von "Intervenierenden Sequenzen" oder "Introns" in die codierende Region für die 28S-rRNA.

Im Hinblick auf die überraschenden Befunde bei Drosophila kommt der Struktur der rDNA in verwandten Organismen einige Bedeutung zu. Die Analyse der ribosomalen Gene anderer Dipteren bzw. Insekten kann eine Aufklärung darüber bringen, ob unterbrochene 28S-Gene ein auf Drosophila beschränkter Einzelfall sind oder nicht und vielleicht dazu beitragen, der Bedeutung und eventuellen Funktion einer Zerstückelung von codierenden Sequenzen auf die Spur zu kommen.

Die Überleitung von den ribosomalen Genen zu den Balbianiringen bedeutet einen Schritt vom Generellen ins Spezielle, denn die Balbianiringe als cytologisch definierte Strukturen

kommen nur in den polytänen Chromosomen der Dipteren vor. In den Balbianiringen, die als überdimensionale Puffs angesehen werden können, manifestiert sich die intensive Transkriptionsaktivität bestimmter Genorte (Beermann, 1952).

Balbianiringe sind ein universelles Kennzeichen der Riesenchromosomen von Chironomiden. Sie treten nicht nur in den Chromosomen der Speicheldrüsen, sondern auch in denen anderer polytäner Gewebe auf, z.B. der Malpighi-Gefäße (Beermann, 1959). Balbianiringe finden sich aber auch in den polytänen Chromosomen vieler anderer Dipteren. Als Beispiele seien die Speicheldrüsenchromosomen der Simuliiden (Rothfels, 1956) und der Drosophila-Spezies D. auraria (Kastritsis und Grossfield, 1971) genannt, sowie die polytänen Chromosomen in den Nährzellen und Borstenbildungszellen bei Calliphora (Ribbert, 1967, 1979).

Charakteristisch für den Hauptteil der Speicheldrüsen von Camptochironomus sind 3 Balbianiringe, BR1, BR2 und BR3, die sich alle im kurzen Chromosom IV ausbilden. BR2 ist gewöhnlich der größte dieser 3 Balbianiringe. Die in der Umgebung des Ausführgangs der Speicheldrüsen gelegenen 4-5 Sonderzellen in C. pallidivittatus zeichnen sich durch den Besitz eines weiteren Balbianirings aus, des BR4. Der BR4 entsteht am äußersten, linken Ende des Chromosoms IV (Beermann, 1961). Er fehlt völlig in den Sonderzellen von C. tentans. Ein Ausnahmefall ist der Balbianiring BR5. Er wurde im Chromosom IV einer in Finnland gesammelten C. pallidivittatus-Population entdeckt (Beermann, 1973) und bildet sich in Laborzucht dieser Tiere nach wenigen Generationen vollständig zurück (Beermann, persönliche Mitteilung). Bei bestimmter Behandlung von Larven kann sich ein Locus auf dem Chromosom III zum Balbianiring entwickeln, der als BR6 bezeichnet wird (Beermann, 1973).

Die Balbianiringe der Speicheldrüsen enthalten die genetische Information für die Speichelproteine (Beermann, 1961; Pelling, 1964; Großbach, 1969, 1973; Hardy und Pelling, 1980a; Rydlander et al., 1980).

Biochemische Daten über Balbianiringe existieren nur für BR1 und BR2 von C. tentans. Besonders der Transkriptionsprozeß ist eingehend analysiert (vgl. Review von Daneholt, 1975). Beide Balbianiringe synthetisieren RNA in der Größenordnung von 75S (Daneholt und Hosick, 1973), die ohne meßbare Größenveränderung in das Cytoplasma gelangt und dort alle Charakteristiken einer Messenger-RNA zeigt, nämlich eine Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende (Edström und Tanguay, 1974) und die Assoziation mit Polysomen (Daneholt et al., 1977). Die Länge der 75S-RNA beträgt etwa 37000 Basen (Case und Daneholt, 1978); d.h. BR1 und BR2 synthetisieren die größte bisher bekannte mRNA. Die zugehörigen Gene müssen also mindestens ebenso groß sein. Ein beträchtlicher Teil der Speichelproteine findet sich in einer sehr hochmolekularen Fraktion; die Molekulargewichtsangaben reichen von 8,2 x 10^5 D bzw. 8,5 x 10^5 D (Hardy und Pelling, 1980b; Rydlander und Edström, 1980) bis 1,4 x 10^6 D (Hertner et al., 1980).

Eine weitere Eigenschaft der Gene in BR1 und BR2 verbindet sie mit den ribosomalen Genen: sie sind repetitiv (Lambert, 1972; Hollenberg, 1976; Wieslander, 1979). Während letztere jedoch eine typische, repetitive Genfamilie darstellen, jedes Gen also in vielen Kopien vorliegt, ist die Repetition der BR-Gene endogen, d.h. ein Gen setzt sich aus repetitiven Elementen zusammen. Vermutlich ähnelt die Struktur der BR-Gene der des Gens für das Seidenfibroin in Bombyx mori. Bei diesem Gen sind interne Sequenzwiederholungen seit längerem bekannt (Suzuki und Brown, 1972; Gage und Manning, 1976; Manning und Gage, 1978).

Mit Sättigungshybridisierungen konnte bislang die Frage nicht geklärt werden, ob BR1 und BR2 jeweils nur 1 Gen oder mehrere Gene enthalten (Hollenberg, 1976; Wieslander, 1979). In BR1 deuten cytologische Befunde auf die Existenz von 2 Genen hin (Beermann, 1952).

Die vorliegende Arbeit untersucht mit Hilfe von Restriktionsanalysen der Genom-DNA, Klonierung und Charakterisierung von Gensequenzen die Organisation der ribosomalen und der Balbianiring-Gene in C. tentans.

II. MATERIAL UND METHODEN

Tiere

Chironomus tentans (Population Plöner See) wurde im Labor bei konstanter Temperatur von 18°C in wassergefüllten Plastikbecken unter Belüftung gezüchtet. Als Substrat diente Cellulosegewebe (Papierbrei). Die Tiere wurden mit Brennnesselpulver gefüttert. Eine kanadische Population von C. tentans (Acton, 1959), genannt Hedy, und C. pallidivittatus stammten aus den Laborzuchten von Dr. H. Tichy. C. thummi wurde als Fischfutter erhalten und auf Grund cytologischer Analysen der Riesenchromosomen mehrerer Larven als C. thummi thummi (Keyl und Strenzke, 1956) bestimmt. C. melanotus Larven wurden bei Falkau (Schwarzwald) gesammelt.

Cytologisches Material

Quetschpräparate von Speicheldrüsenchromosomen aus C. tentans wurden angefertigt nach Hollenberg (1976). Aus Larven des vierten Larvenstadiums wurden nach Abschneiden des Kopfes die Speicheldrüsen herauspräpariert und 45 - 60 sec fixiert in Äthanol-Essigsäure (3:1, v/v). Die Drüsen wurden dann auf einen Objektträger mit einem Tropfen 45 % Essigsäure übertragen, die Zellen vom Speichel abpräpariert und unter einem silikonisierten Deckglas durch leichtes Klopfen mit einer Pinzette gequetscht. Die Präparate wurden auf Trockenschnee eingefroren, nach Absprengen des Deckglases in Äthanol gesammelt und unter Glycerol bei 4°C aufbewahrt.

Zum größten Teil wurden die in dieser Arbeit verwendeten Quetschpräparate von Frau L. Sanader angefertigt.

Bakterienstämme

E. coli 490 ($recA^-$ r_K^- m_K^- met^- thr^- thy^- $lacz^+y^-$) wurde erhalten von Dr. G. Hobom; E. coli AB1157 (dam-4) von Dr. R. Eichenlaub; Staphylococcus aureus 3A von Dr. R. Streeck.

Medien

Sämtliche E. coli-Stämme wurden angezüchtet in L-Broth (1 % Bacto Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl). Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen zugegeben: Penicillin G 100 µg/ml; Tetracyclin 10 µg/ml; Chloramphenicol 150 µg/ml.

Staphylococcus aureus wurde angezüchtet in Nutrient Broth No. 2 (Oxoid).

Nucleinsäure-Isolierungen

Isolierung von hochmolekularer DNA aus Chironomus tentans

Diese Präparation erfolgte nach einer Kombination der Methoden von Rae et al. (1976) und Hollenberg (1976).

10 - 15 g bei -70°C tiefgefrorene Larven wurden mit CO_2 (Trockenschnee) in einem Porzellanmörser möglichst fein zerrieben. Beim Auftauen des Homogenats wurde soviel Puffer A (50 mM Tris - 0,1 M EDTA - 0,32 M Saccharose; pH 7,8) zugefügt, daß sich ein etwa 15 %iges Homogenat ergab. Weitere Homogenisation erfolgte im Dounce-Homogenisator mit dem L-Pistill. Das Roh-Homogenat wurde zweimal filtriert, zunächst durch grobe Gaze mit einem Porendurchmesser von 400 µm, dann durch feine Gaze von 102 µm. Aus dem Filtrat wurden die Zellkerne sedimentiert für 20 min bei 5000 rpm (Sorvall, GSA-Rotor). Das Kernsediment wurde suspendiert in 20 ml Puffer B (50 mM Tris - 0,1 M EDTA; pH 8,5) und an-

schließend gemischt mit 20 ml Puffer C (50 mM Tris - 0,1 M EDTA - 0,5 % Sarkosyl; pH 8,5). Die Lysis der Zellkerne erfolgte bei 65°C für 30 min. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Suspension auf eine Endkonzentration von 1 M $NaClO_4$ gebracht und 10 min stehen gelassen. Die visköse Lösung wurde zweimal extrahiert mit jeweils 1 Volumen H_2O-gesättigtem Phenol und 1 Volumen Chloroform. Die anschliessende Äthanolfällung erfolgte durch Überschichten der DNA-Lösung mit 2 Volumina Äthanol und vorsichtiges Mischen der beiden Phasen, wobei die hochmolekulare DNA als zusammenhängendes Knäuel präzipitiert. Das Präzipitat wurde gelöst in 20 - 40 ml 0,1 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl - 0,015 M Na-citrat; pH 7,0) und nach Lösung auf eine Endkonzentration von 2 x SSC gebracht. Es folgte Verdauung mit RNase (100 µg/ml) und α-Amylase (100 µg/ml), 60 min bei 30°C; anschliessend mit Proteinase K (100 µg/ml) für 3 - 4 Stunden bei 30°C. Nach zweimaliger Extraktion mit Phenol-Chloroform wurde die DNA mit Äthanol ausgefällt wie oben. Die weitere Reinigung der DNA erfolgte über Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Dichtegradienten. Nach Auflösung der DNA in 14 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) - 1 mM EDTA wurde 1,25 g CsCl pro ml DNA-Lösung zugegeben (dies ergibt eine Dichte von 1,7). Die Zentrifugation wurde durchgeführt im Ti60-Rotor (Beckman), 42 Stunden bei 44000 rpm und 20°C. Nach dem Zentrifugenlauf wurde der Gradient fraktioniert und die Lage der DNA-Bande durch Messung der A_{260nm} bestimmt. Die DNA-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, dialysiert gegen 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) und die DNA-Lösung konzentriert entweder durch Äthanolfällung oder durch Dialyse gegen Polyäthylenglykol 6000.

Die DNA-Isolierung aus C. tentans Hedy, C. pallidivittatus und C. melanotus wurden von Dr. C.P. Hollenberg durchgeführt.

Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-Präparationen erfolgten aus sogenannten "cleared lysates" nach den Methoden von Katz et al. (1973) bzw.

Meagher et al. (1977). 300 ml L-Broth (+ Antibiotikum) wurden angeimpft mit 10 ml einer ausgewachsenen Übernachtkultur und bei 37°C inkubiert, bis die Kultur eine A_{600nm} = 0,8 - 1,0 erreicht hatte. Dann wurde Chloramphenicol (150 µg/ml) zugegeben und die Inkubation bei 37°C noch etwa 20 Stunden fortgesetzt. Nach Sedimentation der Zellen erfolgten alle weiteren Schritte bis zum cleared lysate in Eis. Das Zellsediment (0,5 - 1 g) wurde zweimal gewaschen mit 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) - 25 % Saccharose und anschliessend in 10 ml der gleichen Lösung suspendiert. Die Zellen wurden inkubiert mit 150000 U Lysozym (in 2 ml 25 mM Tris-HCl, pH 8,0) für 10 min und noch weitere 5 min nach Zugabe von 2,5 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Die Lysis der Zellen erfolgte durch Mischung der Suspension mit 1 Volumen Detergens-Lösung (50 mM Tris-HCl, pH 8,0 - 50 mM EDTA - 4 % Triton X-100). Zur Entfernung der chromosomalen DNA wurde das hochvisköse Lysat 30 min bei 18000 rpm zentrifugiert (Sorvall, SS34-Rotor). In 14 ml Überstand ("cleared lysate") wurden 13,86 g CsCl aufgelöst und anschließend Ethidiumbromid (1 mg/ml) zugegeben. Die Gleichgewichtszentrifugation erfolgte bei 44000 rpm für 42 Stunden im Ti60-Rotor. Nach dem Zentrifugenlauf wurde die im UV-Licht deutlich sichtbare Bande der Plasmid-DNA aus dem Gradienten isoliert durch seitliches Anstechen des Gradienten-Röhrchens mit einer Spritze und über einen zweiten CsCl-Etidiumbromid-Dichtegradienten weiter gereinigt (Ti50-Rotor; 42 Stunden bei 44000 rpm). Die Plasmid-Bande wurde wie oben aus dem Gradienten isoliert, das Ethidiumbromid aus der DNA-Lösung entfernt durch dreimalige Extraktion mit je 1 Volumen Isoamylalkohol, die DNA-Lösung dialysiert und die DNA schließlich mit Äthanol ausgefällt. Das Präzipitat wurde gelöst in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5).

Die Methode nach Meagher et al. (1977) beinhaltet alle wesentlichen Schritte der obigen Prozedur (Protoplastenbildung mit Lysozym-EDTA, Lysis der Zellen mit Triton X-100, Sedimentation der chromosomalen DNA, 2 aufeinanderfolgende Dichtegradienten). Weggelassen wurde die In vivo-Amplifika-

tion der Plasmid-DNA mit Chloramphenicol; stattdessen wurden die Zellen in 300 ml Hauptkultur bis zur späten stationären Phase gezüchtet. Wegen der größeren Zellmasse wurden die Volumina der oben genannten Lösungen entsprechend erhöht. Vor dem ersten Dichtegradienten wurde das "cleared lysate" mit Phenol extrahiert und die Plasmid-DNA durch Äthanolfällung konzentriert.

Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Zur schnellen Analyse von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen wurden einzelne Transformantenkolonien über Nacht angezüchtet in 2 ml L-Broth und die Plasmid-DNA aus "cleared lysates" isoliert nach Meagher et al. (1977) oder mit der alkalischen Extraktionsprozedur nach Birnboim und Doly (1979). Diese Methode beinhaltet zunächst die Lysozymbehandlung, dann die Lysis der Zellen und gleichzeitige selektive Denaturation der chromosomalen DNA in dem engen pH-Bereich von 12,0 - 12,5 durch Zugabe von SDS-NaOH. Ringförmige, superhelicale Plasmid-DNA denaturiert bei diesem pH nicht. Nach Neutralisation mit 3 M Natriumacetat (pH 4,8) renaturiert die hochmolekulare, chromosomale DNA und bildet dabei unlösliche Aggregate. Die hohe Salzkonzentration verursacht außerdem die Präzipitation von Protein-SDS Komplexen. Das Präzipitat wird abzentrifugiert und die Plasmid-DNA im Überstand durch mehrmalige Äthanolfällung gereinigt. Die in der DNA-Präparation noch enthaltene, niedermolekulare RNA kann durch kurze Behandlung mit RNase entfernt werden.

Isolierung von RNA aus C. tentans

Die Isolierung von Poly(A)$^+$-RNA aus Speicheldrüsen erfolgte nach der Methode von Hollenberg (1976).

Bei -70^{o}C eingefrorene Speicheldrüsen (präpariert von Frau L. Sanader) wurden nach dem schnellen Auftauen homogenisiert in Saline-EDTA (0,15 M NaCl - 0,1 M EDTA, pH 8,0) - 2 % Sarkosyl-Heparin (300 µg/ml) im Dounce-Homogenisator mit dem T-Pistill. Das Lysat wurde extrahiert mit Phenol-Chlo-

roform und die Nucleinsäuren mit Äthanol ausgefällt. RNA und DNA wurden getrennt über einen CsCl-Dichtegradienten (1,25 g CsCl/ml), 42 Stunden bei 44000 rpm im Ti50-Rotor, wobei die RNA zum größten Teil sedimentiert. Nach der Fraktionierung des Gradienten wurde das RNA-Sediment aufgelöst, vereinigt mit den untersten, RNA-haltigen Gradientenfraktionen und die RNA mit Äthanol präzipitiert. Die Anreicherung von Poly(A)$^+$-RNA erfolgte durch Passage der Gesamt-RNA über 2 aufeinanderfolgende Oligo(dT)-Cellulose-Säulen (Aviv und Leder, 1972). Anschließend wurde die Poly(A)$^+$-RNA mit Äthanol gefällt und für die Jodierung in H_2O gelöst.

Bessere RNA-Ausbeuten und Ergebnisse bei der Jodierung und Filterhybridisierung lieferten RNA-Präparationen, die nach der Methode von P. Hardy (persönliche Mitteilung; beschrieben in Büchner-Vollmers und Hollenberg, 1981) von Dr. C.P. Hollenberg durchgeführt wurden.

Ribosomale RNA (ein äquimolares Gemisch aus 18S- und 28S-rRNA) wurde von Dr. C.P. Hollenberg zur Verfügung gestellt.

"Rumpf"-RNA (d.h. Gesamt-RNA aus Larven, denen die Speicheldrüsen entfernt bzw. die ersten 4 Segmente abgeschnitten worden waren) wurde isoliert nach Palmiter (1974). 5 - 10 g tiefgefrorene "Rümpfe" wurden im Mörser mit Trokkenschnee zerrieben und dann aufgetaut in einer Lösung, die zu gleichen Teilen Puffer A (25 mM Tris-HCl, pH 7,5 - 25 mM NaCl - 5 mM $MgCl_2$ - 2 % Triton X-100 - 1 mg/ml Heparin) und 0,1 M Na-acetat (pH 5,0) enthielt. Das Roh-Homogenat wurde weiter zerkleinert im Dounce-Homogenisator mit dem L-Pistill, auf eine Endkonzentration von 0,5 % SDS gebracht, zweimal extrahiert mit Phenol-Chloroform und die Nucleinsäuren anschließend mit Äthanol ausgefällt. Das Präzipitat wurde dreimal gewaschen mit je 10 ml 3 M Na-acetat (pH 6,0), wobei die DNA in Lösung geht, während die RNA gefällt bleibt und abzentrifugiert werden kann. Das RNA-Präzipitat wurde gelöst in 4 ml Puffer A + 4 ml 0,1 M Na-acetat (pH 5,0), die Lösung erneut extrahiert mit Phenol-Chloro-

form, die RNA mit Äthanol präzipitiert und schließlich gelöst in 2 x SSC.

Jodierung

Die Jodierung von ribosomaler RNA und Poly(A)$^+$-RNA erfolgte nach der Methode von Hollenberg (1976). 10 - 20 µg RNA wurden umgesetzt mit 1 mCi Na^{125}J in 45 mM Natriumacetat (pH 5,0) - 5 nM KJ - 190 nM $TlCl_3$ in einem Gesamtvolumen von 200 µl für 15 min bei 70°C. Nach Zugabe von 1 Volumen Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) wurde die Reaktion für 45 min bei 60°C fortgesetzt. Anschließend wurde die RNA über eine Sephadex G75-Säule (0,9 x 19 cm) vom nicht umgesetzten Jodid abgetrennt. Die Reinigung der jodierten RNA erfolgte nach der Methode von Bellamy und Ralph (1968). Die RNA-haltigen Säulenfraktionen wurden gemischt mit 1 Volumen 2,5 M K_2HPO_4 (pH 8,0) und 1 Volumen Methoxyäthanol und etwa 3 min lang bei 0°C gemischt. Die beiden Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt und zur oberen Phase, die die RNA enthält, 1 Volumen 0,2 M Na-acetat und 0,5 Volumen 1 % Cetyltrimethylammoniumbromid gegeben und gut durchgemischt. Bei der anschließenden Inkubation für 60 min in Eis wird die RNA durch das CTA-bromid spezifisch ausgefällt. Das Präzipitat wurde 25 min bei 25000 rpm im Ti60-Rotor abzentrifugiert und dreimal gewaschen mit je 5 ml 70 % Äthanol - 0,1 M Na-acetat, wobei die CTA-RNA in Na-RNA übergeht und CTA-acetat im Überstand bleibt. Zuletzt wurde das Präzipitat in 1 ml 0,1 M Na-acetat gelöst, die RNA mit Äthanol ausgefällt und erneut gelöst in 0,5 - 1 ml 2 x SSC. Die spezifische Aktivität der gereinigten ^{125}J-RNA betrug 10^7 - 10^8 cpm/µg. Die Jodierung der nach P. Hardy isolierten Poly(A)$^+$-RNA wurde von Dr. C.P. Hollenberg durchgeführt.

Reinigung der Restriktionsendonuclease Sau3A

Die Isolierung dieses Enzyms aus Staphylococcus aureus 3A erfolgte nach der von Sussenbach et al. (1976) beschriebenen Methode. 1 Liter Nutrient Broth wurde beimpft mit 100 ml einer ausgewachsenen Vorkultur und die Hauptkultur 4 Stunden bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, 3 mal gewaschen mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) - 15 mM Na-citrat und das Zellsediment (ca. 2 g) schließlich in 3 ml desselben Puffers suspendiert. Es folgte Inkubation mit Lysostaphin (Endkonzentration 5 U/ml) für 15 min bei 37°C unter Schütteln. Nach Zugabe von 1 Volumen Tris-citrat-Puffer (siehe oben) wurden die Zellen abzentrifugiert und suspendiert in 8 ml TM (10 mM Tris-HCl, pH 7,4 - 10 mM Mercaptoäthanol). Der Zellaufschluß erfolgte durch Sonication (Branson Sonifier), 6 mal 1 min unter Kühlung mit Eiswasser. Das Lysat wurde 90 min bei 40000 rpm und 4°C im SW41-Rotor (Beckman) abzentrifugiert, der Überstand durch Zugabe einer frischen Lösung von 10 % Streptomycinsulfat in TM auf eine Endkonzentration von 2 % Streptomycinsulfat gebracht und das Nucleinsäurepräzipitat sedimentiert für 30 min bei 10000 rpm (Sorvall, HB4-Rotor). Der Überstand wurde dialysiert gegen TM und anschließend auf eine DE52 DEAE-Cellulose-Säule geladen (Volumen 30 ml). Die Proteine wurden fraktioniert mit einem linearen KCl-Gradienten, 0 - 0,6 M KCl in Säulenpuffer (10 mM KH_2PO_4 - K_2HPO_4, pH 7,4 - 0,1 mM EDTA - 10 mM Mercaptoäthanol). Das Restriktionsenzym eluierte zwischen 0,15 - 0,33 M KCl. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und die Aktivität konzentriert durch Passage des Pools über eine kleine DE52-Säule (5 ml Säulenvolumen), wobei die gebundenen Proteine mit 0,33 M KCl in Säulenpuffer eluiert wurden. Eine weitere Konzentration des Enzyms erfolgte durch Dialyse der aktiven Fraktionen gegen Säulenpuffer - 50 % Glycerol. In diesem Puffer wurde das Enzym bei -20°C aufbewahrt.

Verdauungen mit Restriktionsendonucleasen

Pro µg DNA wurden 1 - 1,5 U Enzym eingesetzt und die Verdauungen entweder 1 - 2 Stunden oder über Nacht bei der entsprechenden Temperatur durchgeführt. 1 U ist definiert als diejenige Menge Enzym, die 1 µg DNA in 1 Stunde bei optimaler Temperatur vollständig verdaut. Gekaufte Restriktionsenzyme wurden zuerst mit geeigneten Substraten (λ-DNA, SV40-DNA oder pBR322-DNA) nachtitriert.

In den meisten Fällen wurden die vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen verwendet. Die verschiedenen Enzymreaktionen wurden in folgenden Puffern durchgeführt: EcoRI (MILES) in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 - 10 mM $MgCl_2$ - 50 mM NaCl (Greene et al., 1974); HindIII (BOEHRINGER) in 10 mM Tris-HCl, pH 7,6 - 10 mM $MgCl_2$ - 50 mM NaCl - 14 mM DTT; PstI (BOEHRINGER) in 90 mM Tris-HCl, pH 7,5 - 10 mM $MgSO_4$ - 1 mM DTT (Smith et al., 1976); BamHI (BOEHRINGER) in 6 mM Tris-HCl, pH 7,5 - 6 mM $MgCl_2$ - 20 mM KCl - 6 mM DTT (Wilson und Young, 1975); MboI (BIOLABS) in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 - 10 mM $MgCl_2$ - 75 mM NaCl - 1 mM DTT-BSA (100 µg/ml); AluI (BOEHRINGER) in 6 mM Tris-HCl, pH 7,6 - 6 mM $MgCl_2$ - 50 mM NaCl - 10 mM DTT; SaII (MILES) in 8 mM Tris-HCl, pH 7,5 - 6 mM $MgCl_2$ - 0,15 M NaCl - 0,2 mM EDTA-BSA (100 µg/ml); MboII (BIOLABS) in 10 mM Tris-HCl, pH 7,9 - 10 mM $MgCl_2$ - 6 mM KCl - 1 mM DTT-BSA (100 µg/ml); TaqI (BRL) in 10 mM Tris-HCl, pH 8,4 - 6 mM $MgCl_2$ - 0,1 M NaCl - 6 mM Mercaptoäthanol bei 65°C; HinfI (BRL) in 6 mM Tris-HCl, pH 7,4 - 6 mM $MgCl_2$ - 50 mM NaCl - 6 mM Mercaptoäthanol-BSA (100 µg/ml); HincII (BRL) in 10 mM Tris-HCl, pH 7,9 - 6,6 mM $MgCl_2$ - 60 mM NaCl - 6 mM Mercaptoäthanol-BSA (100 µg/ml); HhaI (BIOLABS) in 6 mM Tris-HCl, pH 7,4 - 6 mM $MgCl_2$ - 50 mM NaCl - 6 mM Mercaptoäthanol-BSA (100 µg/ml); XhoI (BIOLABS) in 6 mM Tris-HCl, pH 7,4 - 6 mM $MgCl_2$ - 0,15 M NaCl - 6 mM Mercaptoäthanol-BSA (100 µg/ml); KpnI (BIOLABS) in 6 mM Tris-HCl, pH 7,5 - 6 mM $MgCl_2$ - 6 mM NaCl - 6 mM Mercaptoäthanol-BSA (100 µg/ml); PvuII (BIOLABS) in 6 mM Tris-HCl, pH 7,5 - 6 mM $MgCl_2$ - 60 mM NaCl - 6 mM Mer-

captoäthanol-BSA (100 µg/ml); Sau3A in 6 mM Tris-HCl, pH 7,5 - 15 mM $MgCl_2$ - 60 mM NaCl - 6 mM Mercaptoäthanol bei 30°C (Sussenbach et al., 1976).

Gel-Elektrophoresen

Die Auftrennung von DNA in Agarose erfolgte entweder in zylindrischen Gelen (0,5 x 9 cm) oder in horizontalen Plattengelen. Die Agarose wurde in Elektrophorese-Puffer gelöst durch 20minütiges Kochen im Wasserbad, auf 50°C abgekühlt und dann gegossen. Der Puffer für die zylindrischen Gele enthielt 40 mM Tris-acetat, pH 7,8 - 20 mM Na-acetat - 2 mM EDTA (Loening, 1967) und Ethidiumbromid (0,5 µg/ml). Die Elektrophorese wurde durchgeführt in einer SHANDON-Apparatur mit 2 mA pro Gel für 3 Stunden bei 18°C (das Bromphenolblau in einem leeren Gel war dann etwa 8 cm weit gelaufen). Vor dem Auftragen auf die Gele wurden in jede Probe einige Saccharosekristalle gegeben.

Die Elektrophorese von DNA in horizontalen Agarose-Platten (12 x 15 x 0,5 cm) wurde durchgeführt in einem Elektrophorese-Tank, in dem das Gel in direktem Kontakt zum Puffer steht, d.h. ohne "Brücken" zwischen Puffer und Gel (konstruiert von Dr. W. Schaffner; persönliche Mitteilung von H. Tabak an C.P. Hollenberg). Als Elektrophorese-Puffer wurde folgendes Tris-acetat-Puffersystem verwendet: 40 mM Tris - 40 mM Essigsäure - 1 mM EDTA (auf pH 7,7 eingestellt mit NaOH) - Ethidiumbromid (0,5 µg/ml bzw. 1 µg/ml). Vor der Elektrophorese wurden die Proben gemischt mit 0,25 Volumen einer Agarose-Bromphenolblau-Suspension (Schaffner et al., 1976), die 0,2 % zerkleinerte Agarose in 10 mM Tris-HCl, pH 7,8 - 20 mM EDTA - 10 % Glycerol - 0,01 % Bromphenolblau enthielt. Die Elektrophorese wurde durchgeführt bei 5 V/cm für 4 Stunden bei 18°C.

Die Auftrennung sehr kleiner Restriktionsfragmente wurde in vertikalen Acrylamid-Plattengelen nach Maniatis et al.

(1975) durchgeführt. Als Puffersystem wurde TBE (90 mM Tris - 90 mM Borsäure - 2,5 mM EDTA, pH 8,3) verwendet (Peacock und Dingman, 1959). Für ein 8 %iges Acrylamidgel mit den Dimensionen 150 x 130 x 2 mm wurden 4,5 ml 10 x TBE gemischt mit 12 ml 30 % Acrylamidlösung (29 % Acrylamid - 1 % N,N'-Methylenbisacrylamid), 1,8 ml 1,6 % Ammoniumpersulfat und 26,7 ml H_2O. Nach dem Entgasen der Lösung wurden 15 µl Temed zugegeben und das Gel gegossen. Die Proben wurden in 1 x TBE - 5 % Glycerol - 0,025 % Bromphenolblau auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 4 Stunden bei 100 Volt. Anschließend wurde das Gel für 30 min gefärbt in TBE + Ethidiumbromid (1 µg/ml).

Die DNA-Gele wurden fotografiert im langwelligen UV-Licht (366 nm) mit einer Polaroid MP3 Land Camera durch einen Rot- und Gelbfilter.

Präparative Trennung von Restriktionsfragmenten über Saccharosegradienten

100 µg DNA wurden mit Restriktionsenzymen verdaut und das Verdauungsgemisch anschließend auf einen 8 - 24 % Saccharosegradienten in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 - 1 mM EDTA geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte im SW41-Rotor für 6 - 7 Stunden bei 38000 rpm. Nach Fraktionierung der Gradienten wurde die Verteilung der DNA getestet durch Elektrophorese eines kleinen Teils jeder Fraktion in einem horizontalen Agarosegel. Die gewünschten Fraktionen wurden gepoolt, die Saccharose herausdialysiert, die Lösung etwas konzentriert durch Dialyse gegen Polyäthylenglykol 6000 und anschließend die DNA mit Äthanol ausgefällt.

Transfer-Hybridisierung

DNA-Restriktionsfragmente wurden aufgetrennt in horizontalen Agarose-Plattengelen wie oben beschrieben. Nach Denaturation und Neutralisation der DNA durch leichtes Schütteln des Gels zunächst in 0,5 M NaOH - 1,5 M NaCl (45 - 60 min), dann in 0,5 M Tris-HCl, pH 7,0 - 3 M NaCl (45 - 60 min) wurden die Restriktionsfragmente aus dem Gel auf einen Cellulosenitratfilter transferiert (Southern, 1975). Der Transfer wurde über Nacht durchgeführt; danach war im Gel keine Ethidiumbromid-Fluoreszenz mehr zu erkennen. Der Filter wurde in 2 x SSC gewaschen und anschließend 2 Stunden bei 80°C gebacken. Für die Hybridisierung mit ^{125}J-RNA und ^{3}H-cRNA wurden die einzelnen Gelbahnen aus dem Filter ausgeschnitten. Die Hybridisierungslösung enthielt 50 % Formamid - 5 x SSC; pro Filterstreifen wurden 1 x 10^5 - 3 x 10^5 cpm eingesetzt und nur soviel Lösung, daß der Filterstreifen gerade benetzt war (100 - 160 µl). Die Hybridisierung mit ^{125}J-Poly(A)$^+$-RNA erfolgte unter Kompetition mit einem 500 - 1000fachen Überschuß an kalter "Rumpf"-RNA. Zum Schutz gegen Austrocknung wurden die Filterstreifen einzeln in Haushaltsfolie verpackt und anschließend für 20 - 36 Stunden bei 37°C hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Filter gewaschen: 2 - 3 Stunden in 50 % Formamid - 5 x SSC bei 37°C, dreimal je 20 min in 2 x SSC bei Raumtemperatur; es folgte Behandlung mit RNase (10 µg/ml) in 2 x SSC bei 37°C, dann noch zweimaliges Waschen in 2 x SSC bei Raumtemperatur und zum Schluß Trocknen der Filter an der Luft. Die mit ^{3}H-RNA hybridisierten Filter wurden vor der Exposition in einer Lösung von 20 % PPO in Toluol imprägniert. Die Exposition erfolgte mit einem sensibilisierten Kodak RP Royal X-Omat Röntgenfilm bei -70°C.

Für die Hybridisierung mit nick-translatierter DNA wurden die Filter vorbehandelt in 0,02 % Ficoll - 0,02 % Polyvinylpyrrolidon - 0,02 % BSA (Denhardt, 1966) - 5 x SSC - 0,1 % SDS für 4 - 12 Stunden bei 65°C. Die Hybridisierung erfolgte in 5 x SSC - 0,1 % SDS - 0,02 % Ficoll - 0,02 %

PVP - 0,02 % BSA 16 - 20 Stunden bei 65°C oder in 50 % Formamid - 5 x SSC - 0,1 % SDS - 0,02 % Ficoll - 0,02 % PVP - 0,02 % BSA 16 - 20 Stunden bei 37°C (Lis et al., 1978) mit 1 - 2 x 10^5 cpm pro Gelbahn. Die Filter wurden in Hybridisierungslösung und bei Hybridisierungstemperatur 4 - 7 Stunden gewaschen, dann mehrmals in 2 x SSC bei Raumtemperatur jeweils 30 min. Anschließend wurden die Filter an der Luft getrocknet und mit Röntgenfilm exponiert wie oben beschrieben.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die präparative Rückgewinnung von Restriktionsfragmenten aus Agarose erfolgte entweder nach Tabak und Flavell (1978) oder nach Thuring et al. (1975). Die erste Methode beinhaltet die Elektrophorese des gewünschten DNA-Fragmentes in eine Hydroxyapatit-"Falle". Die Bindung der DNA an das Hydroxyapatit läßt sich anhand der Ethidiumbromid-Fluoreszenz verfolgen. Anschließend wurde das Hydroxyapatit auf eine Sephadex G50-Säule geschichtet, die DNA eluiert mit 0,6 M Natriumphosphatpuffer, von Ethidiumbromid gereinigt durch Passage über eine kleine Dowex-Säule (Dowex Typ 50WX8) und mit Äthanol ausgefällt. Bei der zweiten Methode (sogenanntes "freeze-squeeze") wurde die DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und das Gelscheibchen zwischen Parafilm in Trokkeneis eingefroren. Durch Zusammendrücken des in Parafilm verpackten, gefrorenen Gels mit den Fingern wird die Flüssigkeit zusammen mit der DNA aus dem Gel herausgepreßt. Die Lösung wurde 2 - 3 mal extrahiert mit je 1 Volumen 2-Butanol (Stafford und Bieber, 1975), was eine schnelle Konzentration der Lösung und gleichzeitig eine Entfernung des Ethidiumbromids bewirkt. Nach Extraktion des restlichen Butanols mit Äther wurde die DNA mit Äthanol präzipitiert.

Behandlung von Vektorplasmiden mit alkalischer Phosphatase

Nach Ullrich et al. (1977) kann bei der Ligation von Vektor- und Fremd-DNA die Rezirkularisierung des Vektors verhindert werden, wenn man vorher die terminalen 5'-Phosphate des mit einem Restriktionsenzym linearisierten Plasmids entfernt. Die DNA-Ligase kann nur dann wirken, wenn zumindest 1 intaktes 5'-Phosphat vorhanden ist, d.h. wenn ein Vektormolekül mit einem Fremd-DNA-Molekül zusammentrifft.

Nach der Spaltung mit einem Restriktionsenzym wurde die Vektor-DNA Äthanol-gefällt, gelöst und inkubiert mit bakterieller, alkalischer Phosphatase (SIGMA) in 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) mit 0,1 U pro µg DNA für 30 min bei 65°C (Ullrich et al., 1977). Das Reaktionsgemisch wurde zweimal mit Phenol extrahiert, die DNA zweimal mit Äthanol ausgefällt und das DNA-Präzipitat mehrmals gewaschen mit 70 % Äthanol. Die Effizienz der Phosphatase-Verdauung wurde mit einer Ligation des behandelten Vektors getestet.

Ligation

Die Ligationsreaktion von DNA-Molekülen mit komplementären Einzelstrangenden wurde bei 10°C für 16 - 20 Stunden durchgeführt in 30 mM Tris-HCl, pH 8,0 - 4 mM $MgCl_2$ - 1,2 mM EDTA - 0,2 mM ATP - 10 mM DTT - 50 µg/ml BSA (Modrich und Lehman, 1970) mit 0,5 U T4-DNA-Ligase (MILES) pro µg DNA, oder in 10 mM Tris-HCl, pH 7,9 - 6 mM $MgCl_2$ - 0,1 mM ATP - 10 mM DTT - 100 µg/ml BSA (Collins und Hohn, 1978) mit 1 U T4-DNA-Ligase (BIOLABS) pro µg DNA. Das molare Verhältnis von Vektor- zu Fremd-DNA betrug zwischen 1:1 und 3:1, die totale DNA-Konzentration im Ligationsgemisch 10 - 100 µg/ml. Die Effizienz der Ligation wurde getestet durch Elektrophorese eines Teils des Ligationsgemisches.

Transformation

Die Transformation von E. coli erfolgte mit geringfügigen Veränderungen nach der von Mandel und Higa (1970) entwickelten Calciumchlorid-Methode. 30 ml L-Broth wurden angeimpft mit 0,3 ml einer Übernachtkultur und bei 37°C inkubiert bis A_{600} = 0,6. 20 ml der Kultur wurden abzentrifugiert, die Zellen bei 0°C gewaschen mit 10 mM $CaCl_2$ und dann suspendiert in 1 ml 50 mM $CaCl_2$. 0,2 ml dieser Zellsuspension wurden gemischt mit DNA in 0,1 ml TEN (20 mM Tris-HCl, pH 8,0 - 20 mM NaCl - 1 mM EDTA) - 50 mM $CaCl_2$. Für die Transformation von Ligationsgemsichen in E. coli 490 wurden etwa 100 ng DNA eingesetzt; die Transformation von Plasmiden in E. coli AB1157 wurde wegen des K-Restriktionssystems dieses Stammes mit einem Überschuß an DNA (ca. 5 µg) durchgeführt. Zellen und DNA wurden für 45 min bei 0°C gehalten, dabei gelegentlich gemischt. Es folgte ein 10minütiger Hitzeschock bei 37°C im Wasserbad unter Schütteln. Anschließend wurde die Suspension verdünnt mit 0,7 ml L-Broth, 30 min bei 37°C geschüttelt und dann plattiert auf L-Broth-Platten + Antibiotikum. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet; die Transformanten waren am nächsten Tag gewachsen. Die zur Klonierung verwendeten Plasmid-Vektoren pBR313 und pBR322 (Bolivar et al., 1977a, 1977b) besitzen beide 2 Resistenzen gegen Tetracyclin und Ampicillin, wobei die für die Klonierung günstigen Schnittstellen für HindIII, BamHI, SaII und PstI mitten in einem der beiden Resistenzgene liegen. Durch die Integration von Fremd-DNA in eine dieser Schnittstellen wird das entsprechende Resistenzgen inaktiviert, d.h. die rekombinanten Klone können auf Grund ihrer Sensitivität gegen eines der beiden Antibiotika selektiert werden. Bei den folgenden Klonierungen wurden die HindIII- und BamHI-Restriktionsorte verwendet, wodurch die Tetracyclin-Resistenz des Vektors verlorengeht. Die Zellen wurden daher zur Selektion der Gesamt-Transformanten zuerst auf Penicillin G (100 µg/ml; die Resistenzen von Penicillin und Ampicillin überschneiden sich) plattiert, die Transfor-

manten dann überstempelt auf Tetracyclin (10 µg/ml) und die rekombinanten Klone auf Grund ihrer Sensitivität gegen Tetracyclin identifiziert.

Kolonie-Hybridisierung

Klone mit ribosomalen oder Speicheldrüsen-spezifischen Sequenzen wurden identifiziert durch Hybridisierung von Transformantenkolonien "in situ" (Grunstein und Hogness, 1975). Auf eine Penicillin-Platte wurde ein steriler Cellulosenitratfilter (0,45 µm) gelegt und die Tc^S-Klone einzeln mit sterilen Holzzahnstochern auf diesen Filter übertragen. Nach Inkubation für 20 Stunden bei 37°C wurde der Filter samt den darauf befindlichen Kolonien mit folgenden Lösungen behandelt: Lysis der Kolonien und Denaturation der DNA durch Schwimmenlassen des Filters auf 0,5 M NaOH, 7 min; Neutralisation mit 1 M Tris-HCl (pH 7,4), 5 min; 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4 - 1,5 M NaCl, 5 min. Anschließend wurde der Filter im Vakuum trockengesaugt, wobei die freigesetzte Kolonien-DNA auf den Filter gezogen und gebunden wird. Es folgte Inkubation mit Proteinase K (1 - 2 mg/ml) in 1 x SSC für 30 min bei Raumtemperatur. Der Filter wurde gewaschen mit 5 ml Äthanol, 3mal mit je 5 ml Chloroform, getrocknet, für 2 - 3 min in 0,3 M NaCl gelegt und dann zwischen mehreren Lagen Filterpapier kräftig gedrückt, wodurch die Koloniereste am Filterpapier hängenbleiben. Anschließend wurde der Filter 2 Stunden bei 80°C gebacken. Die Hybridisierung erfolgte in 50 % Formamid - 5 x SSC bei 37°C für 16 - 20 Stunden mit 1 x 10^5 - 3 x 10^5 cpm pro Filter. Der Filter wurde gewaschen 3mal je 10 min mit Chloroform, 20 min in 6 x SSC bei Raumtemperatur, 20 min in 2 x SSC, 30 min inkubiert mit RNase (20 µg/ml) in 2 x SSC bei 37°C, 2mal 20 min in 2 x SSC, getrocknet und exponiert mit Röntgenfilm.

Nick-Translation

Diese In vitro-Markierung von DNA mit radioaktiven Desoxynucleotiden wurde nach Maniatis et al. (1975) durchgeführt. Das Reaktionsgemisch enthielt 0,5 - 1 µg DNA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,8 - 5 mM $MgCl_2$ - 10 mM Mercaptoäthanol - 50 µg/ml BSA, 60 pmol ^{32}P dCTP (350 Ci/mmol), 4 µmol dATP, dGTP und dTTP, 2 U DNA-Polymerase I und 200 pg/ml DNaseI in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Für die Markierung mit ^{3}H wurden 0,5 - 1 nmol ^{3}H dCTP (19,7 Ci/mmol), ^{3}H dATP (13,6 Ci/mmol), ^{3}H dTTP (63,2 Ci/mmol) und 4 µmol dGTP eingesetzt. Die Reaktion erfolgte für 60 min bei 15°C. Nach Zugabe von 1 µl 10 % Sarkosyl und 20 µg E. coli-tRNA wurde das Gemisch mit Phenol extrahiert. Die Phenolphase wurde nachgewaschen mit 50 µl 50 mM Tris-HCl, pH 7,8 - 5 mM $MgCl_2$ - 10 mM Mercaptoäthanol - 50 µg/ml BSA, beide H_2O-Phasen vereinigt und über eine Sephadex G50-Säule (0,6 x 15 cm) geschickt, wobei die DNA von den nicht eingebauten Nucleotiden abgetrennt wird. Bei ^{32}P-Markierung wurden die einzelnen DNA-Fraktionen getrennt aufbewahrt; bei ^{3}H-Markierung wurden die DNA-haltigen Fraktionen vereinigt und die DNA zusammen mit Carrier (100 µg gescherte Kalbsthymus-DNA) Äthanol-gefällt. Das Präzipitat wurde gelöst in Hybridisierungs-Mix für In situ-Hybridisierung (50 % Formamid - 5 x SSC - 10 mM PIPES).

Präparation von ^{3}H-cRNA

Es wurde im wesentlichen nach der Methode von Rae (1970) verfahren. Das Reaktionsgemisch enthielt 40 mM Tris-HCl, pH 7,9 - 10 mM $MgCl_2$ - 0,1 mM EDTA - 0,1 mM DTT - 0,15 M KCl, 2 nmol ^{3}H ATP (27 Ci/mmol), 2 nmol ^{3}H CTP (21 Ci/mmol), 0,2 mmol GTP, 0,2 mmol UTP, 2 - 10 µg DNA (hitzedenaturiert) und 5 U E. coli-RNA-Polymerase in einem Volumen von 50 bzw. 200 µl. Nach Inkubation für 60 min bei 37°C wurden 5 µg bzw. 20 µg DNaseI (Worthington, DPFF) in 0,15 bzw. 0,75 ml

40 mM Tris-HCl (pH 7,9) zugegeben und die Inkubation für 25 min bei Raumtemperatur fortgesetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf eine Endkonzentration von 1 % SDS gebracht, 100 µg E. coli-tRNA zugegeben und mit 1 Volumen Phenol extrahiert. Die Phenolphase wurde nachgewaschen mit 1 Volumen 40 mM Tris-HCl (pH 7,9), beide H_2O-Phasen vereinigt und über eine Sephadex G50-Säule (0,9 x 15 cm) geschickt. Die RNA-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, Äthanol-gefällt und das Präzipitat gelöst in 2 x SSC bzw. 50 % Formamid - 5 x SSC - 10 mM PIPES.

In situ Hybridisierung

Die In situ Hybridisierung an Riesenchromosomen von C. tentans wurde durchgeführt wie von Hollenberg (1976) beschrieben. Die unter Glycerol aufbewahrten Quetschpräparate wurden zunächst zur Entfernung des Glycerols in Äthanol gewaschen, dann 3 mal in 2 x SSC. Es folgte Verdauung mit RNase (100 µg/ml) in 2 x SSC für 60 min bei Raumtemperatur. Nach mehrmaligem Waschen mit 2 x SSC wurde die chromosomale DNA denaturiert durch 3minütiges Kochen der Präparate in 2 x SSC, gefolgt von kurzer Abkühlung in eiskaltem 2 x SSC. Für die kurzzeitige Hybridisierung in 2 x SSC wurde die Flüssigkeit von den Objektträgern mit Kleenex abgewischt, die Präparate aber nicht völlig ausgetrocknet und sofort die Hybridisierungslösung mit der markierten RNA daraufpipettiert (pro Präparat 1 - 3 x 10^5 cpm in 15 µl 2 x SSC) und mit einem Deckglas bedeckt. Die Hybridisierung erfolgte in feuchten Kammern (mit Filterpapier ausgelegten und mit 2 x SSC benetzten Plastik-Petrischalen) für 3 - 4 Stunden bei 65°C. Längere Hybridisierungen wurden durchgeführt in 50 % Formamid - 5 x SSC - 10 mM PIPES (pH 6,8) in 20 µl für 16 - 18 Stunden bei 37°C (Livak et al., 1978). Hierzu wurden die Präparate nach der Denaturation der DNA dehydriert (jeweils 5 min in 50 %, 70 % und 95 % Äthanol) und anschließend ge-

trocknet. Nach der Hybridisierung wurden die Präparate mehrmals in 2 x SSC bei Raumtemperatur gewaschen, dann behandelt mit RNase (20 µg/ml) in 2 x SSC für 45 min bei 30°C, nochmals mit 2 x SSC gewaschen, dehydriert und getrocknet.

Für die Hybridisierung mit ^{3}H-DNA wurden die Quetschpräparate vorbereitet wie oben beschrieben. Die Reaktion erfolgte in 50 % Formamid - 5 x SSC - 10 mM PIPES (pH 6,8) mit gescherter Kalbsthymus-DNA (300 µg/ml) und 1 x 10^5 cpm pro Präparat für 16 Stunden bei 37°C oder 42°C. Die markierte DNA (in Hybridisierungslösung) wurde vorher durch Erhitzung denaturiert (20 min bei 90°C). Die Präparate wurden zunächst 30 min in Hybridisierungslösung und bei Hybridisierungstemperatur gewaschen, dann wiederholt in 2 x SSC bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 5 Stunden und anschließend dehydriert und getrocknet.

Für die Hybridisierung von ^{3}H-DNA an chromosomale Transkripte (Livak et al., 1978) wurde die einleitende RNase-Verdauung weggelassen und die Präparate nach Entfernung des Glycerols mit 95 % Äthanol sofort getrocknet. Hybridisiert wurde wie oben mit 2 x 10^5 cpm pro Präparat bei 37°C. Das Waschen der Präparate erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben.

Autoradiographie

Die hybridisierten Quetschpräparate wurden beschichtet mit der 1:1 verdünnten Fotoemulsion K5 (ILFORD) bei 45°C im Wasserbad in einem speziell dafür konstruierten Gefäß und in Filmentwicklerdosen bei 4°C exponiert.

Entwickelt wurden die Präparate 2,5 min in D19 0,2 % Metol (KODAK) - 9 % Na_2SO_3 - 0,8 % Hydrochinon - 4,5 % Na_2CO_3 - 0,5 % KBR , dann kurz in 2 % Essigsäure und H_2O getaucht, 7 min fixiert, 15 min gewässert und anschließend getrocknet. Die Chromosomen wurden gefärbt mit Toluidinblau (Lambert et al., 1972) oder Giemsa (Gall und Pardue, 1971).

DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung des BR1-Fragmentes wurde unter Anleitung von Dr. R. Renkawitz nach der Maxam-Gilbert-Methode an der Universität Düsseldorf durchgeführt.

III. E R G E B N I S S E

T e i l 1

Die Organisation der ribosomalen Gene von Chironomus tentans

Restriktionsanalysen von Genom-DNA und Klonierung der rDNA

In Chironomus tentans liegen die Gene für die 18S- und 28S-ribosomale RNA in zwei Nucleoli auf den Chromosomen II und III. Ihr Anteil beträgt etwa 0,1 % des haploiden Genoms (Hollenberg, 1976). Die Analyse der ribosomalen Gensequenzen erfolgte zunächst mit der Restriktions-Hybridisationstechnik nach Southern (1975). Aus Larven isolierte Gesamt-DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten, die DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese aufgetrennt, auf einen Cellulosenitratfilter transferiert und mit ^{125}J-markierter rRNA (äquimolares Gemisch aus 18S- und 28S-rRNA) hybridisiert. Die Ergebnisse zeigt Abb. 1. Die Restriktionsenzyme HindIII, EcoRI, PstI und BamHI liefern jeweils nur eine stark markierte Hauptbande. Mit HindIII und PstI liegt sie in der Größenordnung von 8 kb, mit EcoRI ist sie etwas kleiner und mit BamHI erheblich größer; im letzteren Fall wandert sie mit den größten DNA-Fragmenten des Verdauungsgemisches. Das Auftreten eines einzigen, markierten Fragmentes schließt eine Heterogenität der rDNA wie bei Drosophila oder Xenopus aus und legt im Fall der HindIII- und PstI-Verdauung die Vermutung nahe, daß die repetitive Untereinheit der rDNA von diesen Restriktionsenzymen nur einmal geschnitten wird und das 8 kb-Fragment demnach ein ganzes rDNA-Cistron enthält.

Zur weiteren Analyse der rDNA wurde deshalb das 8 kb HindIII-Fragment durch Klonierung in E. coli isoliert. 20 µg C. ten-

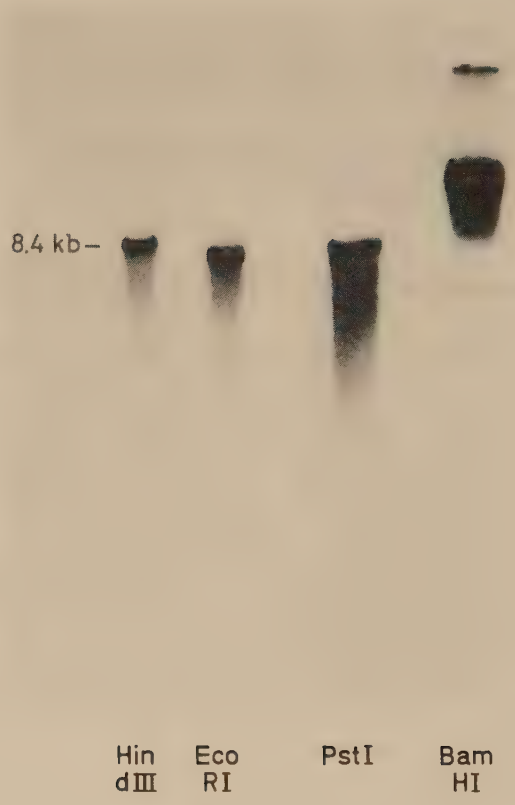


Abb. 1: Nachweis von ribosomalen Gensequenzen in der Genom-DNA von C. tentans. Jeweils 5 µg DNA wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut, die Fragmente in Agarosegelen aufgetrennt und auf Cellulosenitratfilter transferiert. Anschließend wurden die Filter hybridisiert mit ^{125}J-rRNA.

tans-DNA wurden mit HindIII gespalten und die Fragmente in einem 0,7 % Agarosegel aufgetrennt. Die 8 kb-Region wurde aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA mit der Freeze-Squeeze-Methode aus der Gelscheibe isoliert und ligiert mit dem HindIII-verdauten Plasmidvektor pBR313. Das Ligationsgemisch wurde transformiert in E. coli 490 r_K^- m_K^- $recA^-$. Die Kolonie-Hybridisierung der Pen^r Tc^s-Transformanten mit ^{125}J-rRNA ergab 6 positive Klone (pCt111, pCt151, pCt194, pCt250, pCt306, pCt318). Abb. 2 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der Plasmid-DNAs aus diesen Klonen.

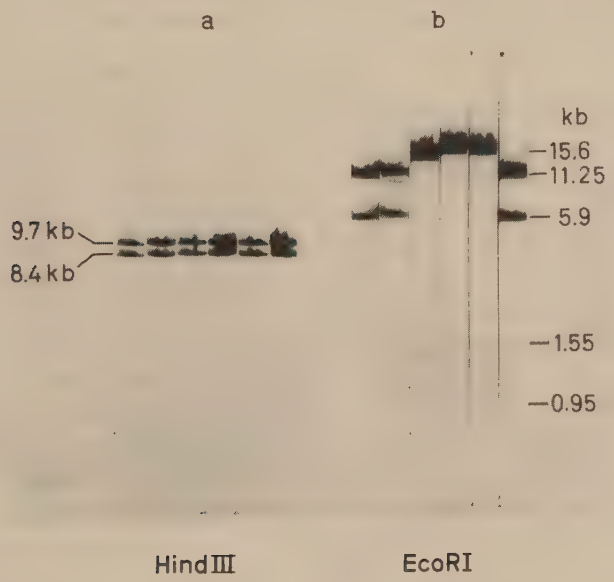


Abb. 2: Charakterisierung der Plasmid-DNA aus 6 rDNA-Klonen durch Verdauung mit den Restriktionsenzymen HindIII und EcoRI. Die Gelbahnen enthalten von links nach rechts die rekombinanten Plasmide pCt111, pCt194, pCt151, pCt306, pCt250 und pCt318.

HindIII spaltet die Plasmide in 2 Fragmente von 9,7 kb und 8,4 kb auf (Abb. 2); das größere entspricht dem linearisierten pBR313, das kleinere dem prominenten, ribosomalen HindIII-Fragment in der Genom-DNA. Die Klonierung der rDNA wird außerdem bewiesen durch die In situ-Hybridisierung an Speicheldrüsenchromosomen: ^{3}H-cRNA zu pCt318 markiert ausschließlich die beiden Nukleolen (Abb. 3).

Die Verdauung der rekombinanten Plasmide mit EcoRI (Abb. 2) verdeutlicht die beiden möglichen Orientierungen des rDNA-Fragmentes in bezug auf den Vektor. Es gibt 2 verschiedene Muster von EcoRI-Fragmenten, beide vertreten durch 3 Plasmide. Jedes Plasmid besteht aus 3 EcoRI-Fragmenten, deren Längen sich zu 18,1 kb, der Größe jedes rekombinanten Plas-

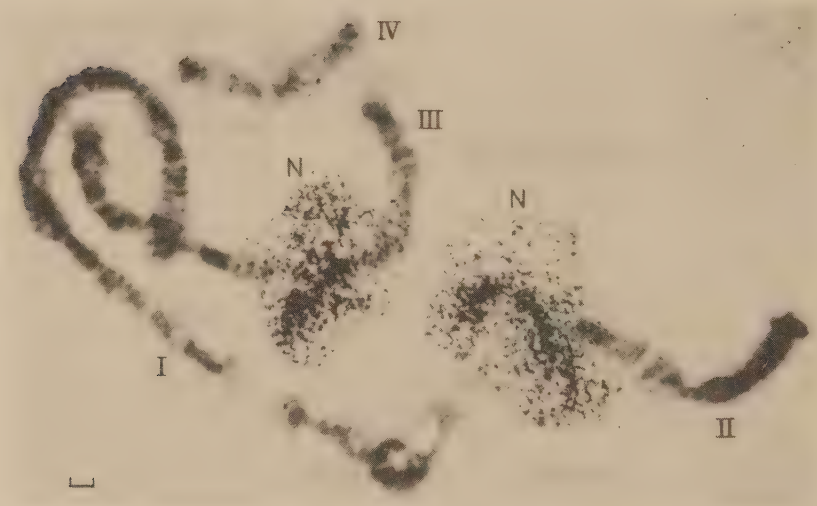


Abb. 3: In situ Hybridisierung von pCt318 ^{3}H-cRNA an Speicheldrüsenchromosomen von C. tentans. Die Hybridisierung erfolgte in 2 x SSC für 3 Stunden bei 65°C mit 10^{5} cpm pro Präparat. Die einzelnen Chromosomen sind mit römischen Ziffern gekennzeichnet, die beiden Nukleolen mit dem Buchstaben N. Vergrößerung 450fach.

mids, summieren. Da der Vektor pBR313 nur eine Erkennungssequenz für EcoRI hat, bedeuten 3 Fragmente das Vorhandensein von 2 EcoRI-Schnitten innerhalb der rDNA. Das rDNA-interne EcoRI-Fragment muß in allen Plasmiden identisch sein, was für das kleinste Fragment von 0,95 kb zutrifft. Dieses Fragment wurde allerdings bei der Hybridisierung EcoRI-verdauter Genom-DNA mit rRNA nicht beobachtet. Daraus folgt, daß das 0,95 kb Fragment in einem Teil des Cistrons liegen muß, der in der cytoplasmatischen rRNA nicht vertreten ist, d.h. in einem der beiden Spacer. Diese Vermutung bestätigt sich dadurch, daß bei Hybridisierung von EcoRI-verdauter Gesamt-DNA mit einem der rDNA-Plasmide auch das kleine EcoRI-Fragment markiert wird (siehe Abb. 10b).

Restriktionskartierung der rDNA

Für die Restriktionskartierung wurden als Repräsentanten der beiden Orientierungen der rDNA die rekombinanten Plasmide pCt111 und pCt151 ausgewählt. Die Spaltungen dieser Plasmide mit HindIII, EcoRI, PstI und BamHI sowie die Doppelverdauungen mit verschiedenen Kombinationen dieser Enzyme zeigt Abb. 4. PstI produziert in beiden Fällen 4 Fragmente, was wegen der 3 bekannten Spaltstellen in pBR313 einen PstI-Schnitt pro rDNA-Segment bedeutet. Mit BamHI entsteht lediglich 1 Fragment, das der Größe des linearisierten, rekombinanten Plasmids entspricht. Die klonierte rDNA hat demnach keine Erkennungssequenz für BamHI, in Übereinstimmung mit der Southern-Hybridisierung von Abb. 1. Die Linearisierung der rekombinanten Plasmide ist auf den einzelnen BamHI-Schnitt in pBR313 zurückzuführen.

Die Größen der verschiedenen Restriktionsfragmente sind in Tabelle 1 zusammengefaßt; Abb. 5 zeigt die Restriktionskarten von pCt111 und pCt151.

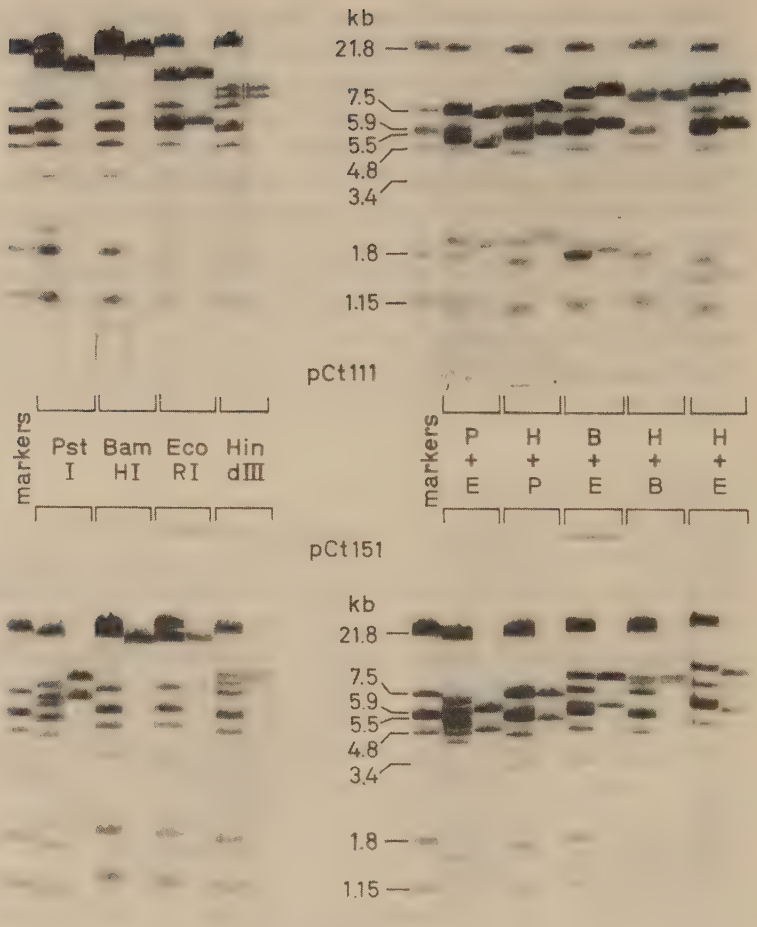


Abb. 4: Restriktionskartierung der rekombinanten Plasmide pCt111 und pCt 151, die das rDNA-Fragment in umgekehrter Orientierung enthalten. Die Größenbestimmungen erfolgten mit den EcoRI-Fragmenten der λ-DNA (21,7; 7,52; 5,83; 5,64; 4,85; 3,84 kb; Philippsen et al., 1978) und den 3 größten HindIII-Fragmenten der SV40-DNA (1,77; 1,16; 1,10 kb; Fiers et al., 1978) als internen Standardlängen. Die Größenstandards alleine sind jeweils in den Gelen links außen gezeigt. Jede Restriktionsverdauung wurde in 2 Parallelgelen aufgetrennt, einmal mit und einmal ohne die Größenstandards. P = PstI; E = EcoRI; H = HindIII; B = BamHI.

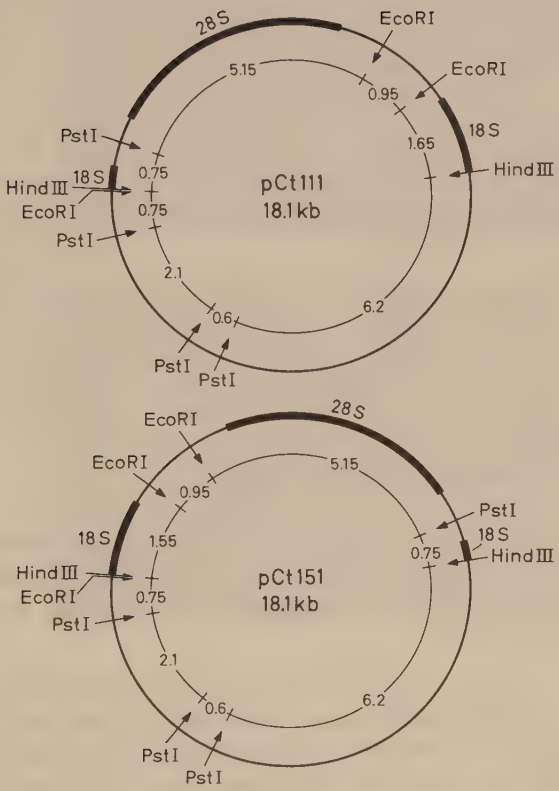


Abb. 5: Restriktionskarte der Plasmide pCt111 und pCt151. Die beiden HindIII-Schnittstellen trennen das rDNA-Cistron vom Vektorplasmid pBR313. Die Positionen der Gene für 18S- und 28S-rRNA sind aus der R-Loop Karte von Abb. 7 abgeleitet. Die Zahlen im inneren Kreis geben die Größe der Restriktionsfragmente in kb an.

Tabelle 1: Größen der Restriktionsfragmente von pCt111 und pCt151 (bestimmt aus den Gelen in Abb. 4)

Restriktionsenzym	Fragmentgrößen in kb	
	pCt111	pCt151
HindIII	9,7; 8,4	9,7; 8,4
EcoRI	11,25; 5,9; 0,95	15,6; 1,55; 0,95
PstI	13,9; 2,1; 1,5; 0,6	8,4; 7,0; 2,1; 0,6
HindIII + EcoRI	9,7; 5,9; 1,55; 0,95	9,7; 5,9; 1,55; 0,95
HindIII + PstI	7,7; 6,2; 2,1; 0,75; 0,75; 0,6	7,7; 6,2; 2,1; 0,75; 0,75; 0,6

R-Loop-Kartierung und Heteroduplexanalyse der rDNA

Die folgenden Daten beruhen auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen und Messungen von Herrn Dr. Hans-Dieter Royer. Die Methoden sind beschrieben in Degelmann, Royer und Hollenberg (1979).

Die Kartierung der Gene für die 18S- und 28S-rRNA erfolgte an pCt318 mit der sogenannten R-Loop Technik (White und Hogness, 1977). Bei Hybridisierung mit 18S- und 28S-rRNA aus C. tentans zeigt pCt318 3 R-Loops (Abb. 6a). Der größte entspricht der Länge der 28S-rRNA, die beiden kleineren zusammen der Länge der 18S-rRNA. Offenbar liegt der HindIII-Schnitt, an dem die rDNA integriert ist, im Gen für die 18S-rRNA. Dies zeigt sich besonders deutlich, wenn für die R-Loop Bildung die mit HindIII ausgeschnittene rDNA alleine verwendet wird (Abb. 6b). Die 28S-rRNA liegt etwa in der Mitte des Fragmentes und die nicht gepaarten Enden des Moleküls ergeben zusammen die Länge der 18S-rRNA. Der 28S-Loop wird flankiert von einem kurzen und einem längeren Spacer.

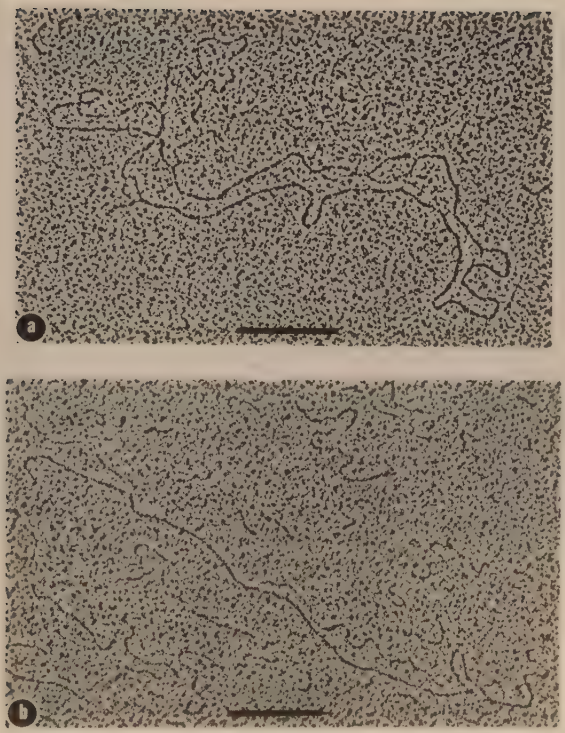


Abb. 6: Elektronenmikrographen von R-Loops zwischen der klonierten rDNA und 18S- und 28S-rRNA.
a) R-Loops mit pCt318; b) R-Loops mit dem aus pCt318 isolierten rDNA-Fragment. Der eingezeichnete Längenmaßstab repräsentiert 1 kb.

Die Orientierung der rDNA in pCt318 relativ zum BamHI-Schnitt des Vektors wurde mit der Gen 32-Methode bestimmt (Pellegrini et al., 1977). Abb. 7 zeigt ein mit dieser Technik präpariertes DNA:RNA-Hybridmolekül.

Die elektronenmikroskopischen Daten legen den Schluß nahe, daß die klonierte rDNA das gesamte ribosomale Cistron repräsentiert, bestehend aus den Genen für die 18S- und 28S-

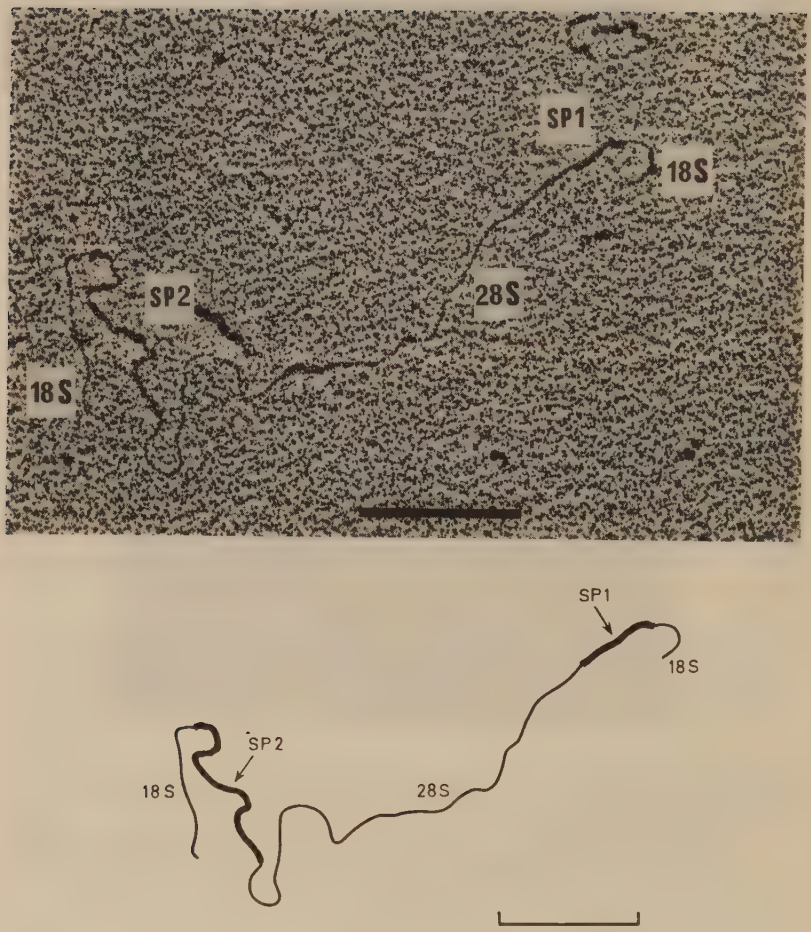


Abb. 7: Elektronenmikrograph eines Hybridmoleküls zwischen der isolierten rDNA und 18S- und 28S-rRNA. Die Präparation erfolgte mit der Gen32 Technik nach Pellegrini et al. (1977). Mit dieser Technik erscheinen die doppelsträngigen Hybridregionen dünn und die einzelsträngigen DNA-Bereiche dick. Die Positionen von 18S- und 28S-rRNA Sequenzen und den beiden Spacern (Sp1 und Sp2) sind gekennzeichnet. Der Längenmaßstab repräsentiert 1 kb.

rRNA, einem transkribierten und einem nicht transkribierten Spacer. HindIII schneidet dieses Cistron innerhalb des Gens für die 18S-rRNA.

In Abb. 8 ist das klonierte, ribosomale Cistron anhand der R-Loop-Messungen schematisch dargestellt. Abb. 5 zeigt die Restriktionskarten der Plasmide pCt111 und pCt151; die Lage der Gene für 18S- und 28S-rRNA ist aus der R-Loop-Karte abgeleitet.

Aus Abb. 2b geht hervor, daß die Länge der rDNA in allen 6 Klonen identisch ist. Ob auch die Nucleotidsequenzen weitgehend übereinstimmen, wurde mit Heteroduplex-Analyse getestet. Die aus den 6 Plasmiden isolierten rDNA-Fragmente wurden wechselseitig miteinander hybridisiert und die Heteroduplex-Moleküle im Elektronenmikroskop analysiert. In allen Kombinationen fanden sich stets vollständig gepaarte DNA-Moleküle. Eine größere Sequenzheterogenität von mehr als 100 Basenpaaren (das ist die untere Grenze des Auflösungsvermögens bei Heteroduplex-Analysen) zwischen den klonierten Cistren ist daher ausgeschlossen.

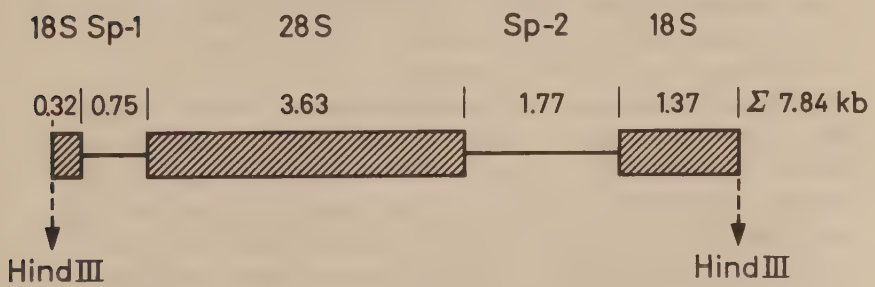


Abb. 8: Schematische Darstellung der R-Loop Karte des klonierten, ribosomalen Cistrons von C. tentans. Die Gene für 18S- und 28S-rRNA sind als schraffierte Blöcke gezeichnet; die Linien repräsentieren die beiden Spacer. Die Längen der Gene und Spacer sind in kb angegeben.

Ribosomale "single copy"-Sequenzen in der Genom-DNA

Das Southern-Autoradiogramm von HindIII-gespaltener Genom-DNA (Abb. 1) zeigt neben dem prominenten Fragment von 8,4 kb noch einige schwach markierte Fragmente mit ribosomalen Gensequenzen. Diese könnten auf Heterogenität einiger rDNA-Cistren oder auf die "Fusionsfragmente" oder beides zurückzuführen sein. Fusionsfragmente müssen dort entstehen, wo die nukleoläre DNA an benachbarte, nichtribosomale DNA-Sequenzen angrenzt. Da C. tentans 2 Nukleolen hat, sind 4 Fusionsfragmente zu erwarten, die sich in der Größe voneinander und von den ribosomalen Cistren unterscheiden sollten. Die Fusionsfragmente sind "single copy"-Sequenzen, d.h. jedes liegt im haploiden Genom in nur einer Kopie vor. Ob eine einzige rDNA-Kopie pro Genom unter den verwendeten Hybridisationsbedingungen noch aufzufinden wäre, wurde mit folgendem Experiment getestet: 5 µg E. coli-DNA wurde mit soviel Plasmid pCt250 gemischt, daß die vorhandene rDNA 1, 2 und 10 Kopien pro haploidem C.tentans-Genom entsprechen würde. Die DNA-Mischungen wurden mit HindIII gespalten, transferiert und hybridisiert mit ^{125}J-rRNA. Die Zahl der rDNA-Kopien wurde folgendermaßen berechnet: Die Größe des C. tentans-Genoms beträgt etwa 1,8 x 10^5 kb. 1 rDNA-Kopie von 8,4 kb wäre dann 0,005 % des Genoms. 0,005 % von 5 µg (E. coli-DNA) sind 0,25 ng (rDNA). Da die rDNA etwa die Hälfte des rekombinanten Plasmids einnimmt, wurden jeweils 5 µg E. coli-DNA mit 0,5 ng, 1 ng und 5 ng pCt250-DNA gemischt (1, 2 und 10 Kopien). Abb. 9 zeigt das Ergebnis dieses "Genzahl"-Experimentes. 1 rDNA-Kopie tritt als deutliche Bande hervor; das bedeutet, daß auch Teile der rDNA, wie sie in Fusionsfragmenten zu erwarten wären, noch entdeckt werden müßten. Maximal 4 der schwach markierten Banden in Abb. 1 könnten demnach Fusionsfragmente enthalten. Da aber insgesamt 8 schwache Banden zu sehen sind, liegt sehr wahrscheinlich Heterogenität in einer geringen Anzahl der rDNA-Cistren vor.

Abb. 9: "Genzählungs"-Experiment zum Nachweis eines einzigen rDNA-Cistrons. Jeweils 5 µg E. coli-DNA wurden gemischt mit derjenigen Menge an pCt250-DNA, die 10, 2, 1 und 0 rDNA-Kopien pro C. tentans Genom entsprechen würde und anschließend mit HindIII verdaut. Die Berechnung der notwendigen Mengen an pCt250-DNA ist im Text ausgeführt. Hybridisiert wurde mit ^{125}J-rRNA in 50 % Formamid - 5 x SSC bei 42°C (bei 37°C hybridisiert die rRNA von C. tentans mit ribosomalen Genfragmenten von E. coli).
a) 10 Kopien; b) 2 Kopien; c) 1 Kopie; d) 0 Kopien.

Vergleich der ribosomalen DNA verschiedener Chironomus-Arten

Die Analyse der ribosomalen Gene von C. tentans Hedy (eine kanadische Population von C. tentans), C. pallidivittatus, C. thummi thummi und C. melanotus erfolgte mit der Southern-Technik. Aus Larven wurde Gesamt-DNA isoliert, mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und nach Transfer hybridisiert mit ^{125}J-rRNA aus C. tentans oder mit pCt194 ^{32}P-DNA. Die Ergebnisse dieser Hybridisierungen zeigt Abb. 10.

HindIII und EcoRI produzieren bei C. tentans und C. tentans Hedy identische rDNA-Fragmente. Die mit C. tentans eng verwandte Art C. pallidivittatus (beide werden auch mit dem Gattungsnamen "Camptochironomus" bezeichnet und lassen sich miteinander kreuzen) unterscheidet sich bei EcoRI-Spaltung nicht von C. tentans, zeigt aber nach HindIII-Verdauung 3 prominente rDNA-Fragmente. Die beiden kleineren (5 kb und 3 kb) ergeben zusammen die Länge des größten, schwächer hybridisierenden Fragmentes, das wegen der identischen EcoRI-Fragmente die gleiche Größe haben muß wie bei C. tentans. Daraus folgt, daß C. pallidivittatus als Resultat eines Basenaustausches in der Mehrheit der ribosomalen Cistren eine zusätzliche Erkennungssequenz für HindIII hat.

Die HindIII- und EcoRI-Profile von C. thummi und C. melanotus unterscheiden sich grundlegend von denen der Camptochironomus-Arten. In der Region von etwa 7 - 10 kb treten breite Hybridisierungszonen auf, die keine scharfen Begrenzungen zeigen. Die Markierung "schmiert" sowohl in Bereiche niedrigeren als auch höheren Molekulargewichtes.

Mit HindIII sind bei C. thummi und C. melanotus innerhalb des Schmiers noch Banden zu entdecken. Beide Spezies enthalten zusätzlich ein diskretes rDNA-Fragment von etwa 1,5 kb (C. thummi) und etwa 1 kb (C. melanotus), was auf die Existenz von mindestens 2 HindIII-Schnitten pro rDNA-Cistron hindeutet. Die breiten, verwischten Hybridisationsbereiche können nicht durch Degradation des verwendeten DNA-

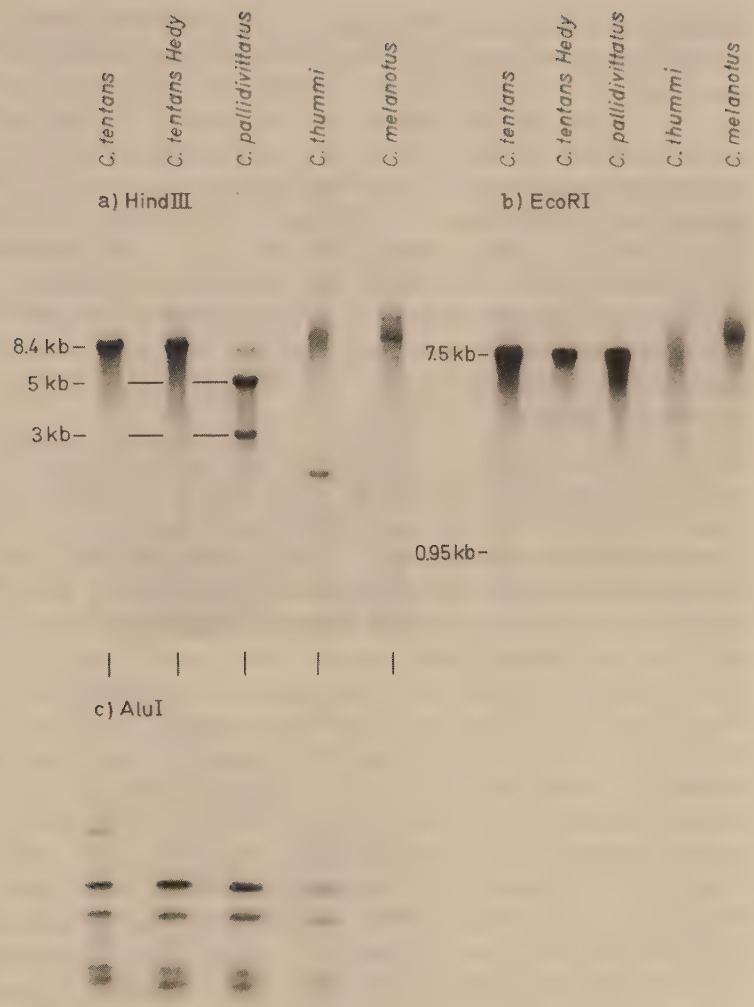


Abb. 10: Vergleich der ribosomalen DNA aus verschiedenen Chironomus-Arten (C. tentans, C. tentans Hedy, C. pallidivittatus, C. thummi thummi, C. melanotus) durch Restriktionsanalysen. Die fragmentierte Genom-DNA wurde hybridisiert mit ^{125}J-rRNA (a) oder mit pCt194 ^{32}P-DNA (b, c).
a) HindIII; b) EcoRI; c) AluI.

Präparates allein erklärt werden, da in diesem Fall der Schmier nach oben scharf begrenzt wäre von der einheitlichen Länge des intakten Restriktionsfragmentes (siehe z.B. Abb. 1, PstI-Verdauung). Wegen des Vorhandenseins der diskreten, kleinen Fragmente scheidet auch unvollständige Verdauung oder das Fehlen einer HindIII-Erkennungssequenz im Cistron aus. Somit müssen die verwaschenen Hybridisierungsbereiche im Sinne einer umfangreichen Längen- oder Sequenzheterogenität (oder beides) in den rDNA-Cistren gedeutet werden. Die diskreten Fragmente entstehen durch 2 HindIII-Schnitte in einem homogenen Teil der Cistren, also mindestens zum Teil innerhalb einer codierenden Sequenz für die 18S- bzw. 28S-rRNA.

Die Ergebnisse mit EcoRI sehen ähnlich aus. C. thummi zeigt lediglich einen Schmier ohne diskrete Fragmente; bei C. melanotus liegt innerhalb des Schmiers eine ziemlich stark hybridisierende Bande. Um die Heterogenität innerhalb der einzelnen Repetitionseinheiten näher einzugrenzen, wurde die DNA aus den verschiedenen Spezies schließlich noch mit AluI verdaut. Dieses Enzym erkennt eine Sequenz von nur 4 Nucleotiden und produziert daher kleinere Fragmente als HindIII und EcoRI. Wie Abb. 10c zeigt, ergeben sich mit AluI keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies. 4 Fragmente (0,45; 0,5; 0,7 und 0,9 kb) sind allen Arten gemeinsam und liegen deshalb wahrscheinlich in codierenden Sequenzen. Das erste (1,2 kb) und das vierte Fragment (0,6 kb) kommen in C. tentans, C. thummi und C. melanotus vor, nicht dagegen in C. tentans Hedy und C. pallidivittatus, wo statt der fehlenden Fragmente aber auch keine neuen auftreten. Die Möglichkeit kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Fragmente 1 und 4 aus einer unvollständigen Spaltung der DNAs durch AluI herrühren. Die Hybridisierung der AluI-Verdauungen wurde mit pCt194 ^{32}P-DNA durchgeführt; sämtliche markierten Fragmente in Abb. 10c hybridisieren aber auch mit ^{125}J-RNA (die Daten sind hier nicht gezeigt) und müssen also Gensequenzen enthalten. Die Spacer-internen AluI-Fragmente sind offenbar so klein, daß sie mit dieser

Gelhybridisierung nicht mehr nachgewiesen werden konnten, denn andernfalls sollten mit pCt194 mehr Fragmente auftreten als mit rRNA. Ebensowenig wie Spacer-spezifische DNA-Fragmente läßt die AluI-Verdauung Heterogenität bei C. thummi und C. melanotus erkennen. Wenn die Heterogenität in den Spacern liegt, dann trifft wahrscheinlich die obige Erklärung für das Fehlen von Spacer-internen Sequenzen auch auf die Abwesenheit von Heterogenität zu, nämlich die Kürze der betreffenden AluI-Fragmente. Intervenierende Sequenzen könnten mit dem homogenen rDNA-Klon zwar nicht hybridisieren, aber man sollte in diesem Fall heterogene Fusionsfragmente von Gen- und Intronsequenzen erwarten. Die Verdauung zeigt jedoch nichts dergleichen. Möglicherweise werden eventuell vorhandene, intervenierende Sequenzen von AluI ziemlich spezifisch aus den Genen ausgeschnitten, so daß sich die Heterogenität der Fusionsfragmente nicht manifestiert.

Mit Southern-Analysen allein ist die Struktur der ribosomalen Gene in C. thummi und C. melanotus nicht aufzuklären. Hier könnte nur die Klonierung einiger Cistren weiterhelfen.

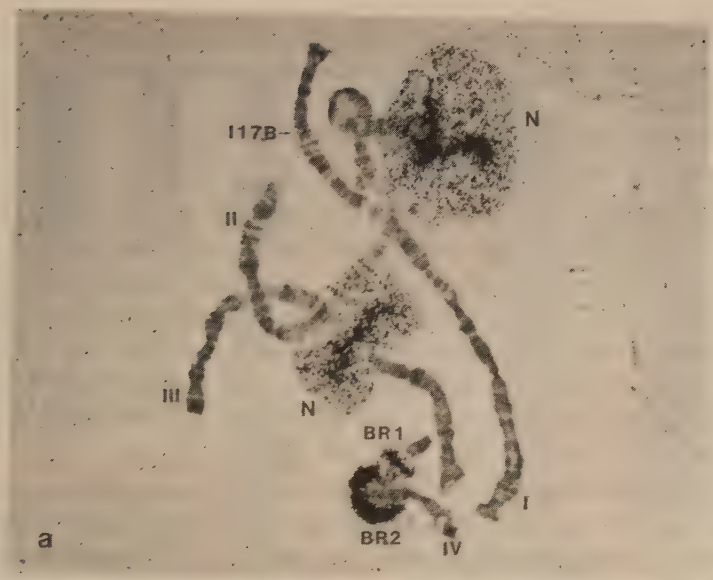
Teil 2

Die Struktur der Balbianiring-Gene von Chironomus tentans

Restriktionsanalyse der Genom-DNA

Der erste Schritt zur Klonierung von Balbianiring-Sequenzen bestand wie bei den ribosomalen Genen in der Southern-Analyse von Restriktionsfragmenten der Genom-DNA. Als Hybridisierungsprobe diente ^{125}J-Poly(A)$^+$-RNA aus Speicheldrüsen, die, wie Hollenberg (1976) durch In situ Hybridisierung nachwies, Balbianiring-RNA spezifisch angereichert enthält. Hybridisierung von ^{125}J-Poly(A)$^+$-RNA an Speicheldrüsenchromosomen ergibt Markierung des BR1, BR2 und eines Puffs im Abschnitt 17B des Chromosoms I, sowie auch der beiden Nukleolen (Abb. 11a). Die Markierung der Nukleolen rührt daher, daß die Poly(A)$^+$-RNA Präparation noch ribosomale RNA enthält und kann durch Kompetition mit einem Überschuß an kalter "Rumpf"-RNA verhindert werden. Die Gegenwart der Kompetitor-RNA läßt Hybridisierung eines weiteren Chromosomenortes erkennen, des BR6 (Abb. 11b). Der BR6-Locus liegt im Chromosom III sehr dicht am Nukleolenbildungsort und wird normalerweise vom Nukleolus verdeckt.

Abb. 11: In situ Hybridisierung der Speicheldrüsenchromosomen von C. tentans mit ^{125}J-Poly(A)$^+$-RNA aus Speicheldrüsen. Die Hybridisierung erfolgte in 2 x SSC für 3 Stunden bei 65°C mit 10^5 cpm pro Präparat. Die Chromosomen sind mit römischen Ziffern gekennzeichnet. N = Nukleolus; BR = Balbianiring; I17B = Puff im Abschnitt B des Chromosoms I.
a) Hybridisierung mit ^{125}J-Poly(A)$^+$-RNA; Vergrößerung 400fach.
b) Hybridisierung mit ^{125}J-Poly(A)$^+$-RNA in Gegenwart eines etwa 1000fachen Überschusses an "Rumpf"-RNA; Vergrößerung 700fach.


I17B
N
II
III
N
BR1
I
a
BR2
IV

IV
BR1
N
BR2
I17B
BR6
N
I
II
III
b

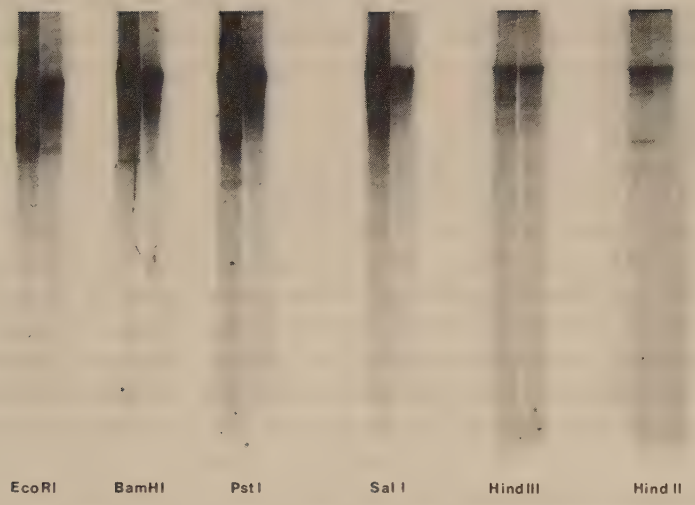
Etwa 90 % der speicheldrüsenspezifischen Sequenzen in der Poly(A)$^+$-RNA sind nach In situ Hybridisierung in BR1 und BR2 konzentriert (Hollenberg, 1976). Poly(A)$^+$-RNA sollte daher zum Nachweis von BR1- und BR2-Gensequenzen in der Genom-DNA geeignet sein.

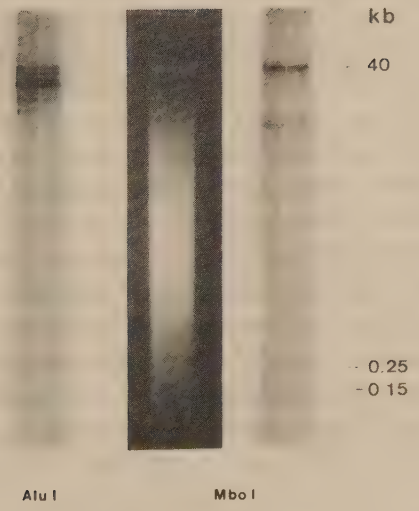
Eine Sonderstellung unter den Balbianiringen nimmt der BR3 ein. In situ Hybridisierung an BR3 wurde nie beobachtet (Lambert, 1972; Hollenberg, 1976). Dies ist wahrscheinlich auf die "single copy" Natur dieses aktiven Genortes zurückzuführen, denn die In situ Hybridisierung, so wie sie hier durchgeführt wurde, erfaßt vorwiegend repetitive Sequenzen. Die im folgenden verwendete Abkürzung "BR" für Balbianiring bezieht sich daher nur auf BR1 und BR2.

Nach der vollständigen Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen und Transfer der Fragmente auf Cellulosenitratfilter wurden die einzelnen Gelbahnen aus dem Filter ausgeschnitten und der Länge nach halbiert. Beide Filterhälften wurden hybridisiert mit der gleichen Menge ^{125}J-Poly(A)$^+$-RNA, einmal ohne und einmal mit "Rumpf"-RNA als Kompetitor. Abb. 12 zeigt die Ergebnisse dieser Hybridisierungen mit EcoRI, BamHI, PstI, SalI, HindIII und HindII. BR-Sequenzen finden sich im Bereich der größten Restriktionsfragmente in einer mehr oder weniger definierten Bande, abhängig von der Ausgangsgröße der verwendeten Genom-DNA. Wegen der schlechten

---

Abb. 12: Nachweis von spezifisch in Speicheldrüsen exprimierten Sequenzen in der Genom-DNA von C. tentans. Die DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut und die Fragmente nach Gelelektrophorese auf Cellulosenitratfilter transferiert. Jeder Filterstreifen wurde der Länge nach halbiert und beide Hälften hybridisiert mit der gleichen Menge ^{125}J-Poly(A)$^+$-RNA, in Abwesenheit (linke Filterhälften) und in Gegenwart von kompetierender "Rumpf"-RNA (rechte Filterhälften). Neben dem Autoradiogramm der MboI-Verdauung ist die Ethidiumbromidfärbung derselben Verdauung vor dem Transfer der DNA gezeigt. Die Fragmente in der hochmolekularen MboI-Bande (MboI-1) sind, wie später festgestellt wurde, rund 40 kb lang.


EcoRI
BamHI
Pst I
Sal I
HindIII
Hind II


kb
40
0.25
0 15
Alu I
Mbo I

Trenneigenschaften von Agarosegelen in diesen Größenordnungen konnte die Länge der BR-Fragmente nicht genau bestimmt werden. Sicher ist jedoch, daß sie langsamer wandern als das EcoRI-Fragment A der λ-DNA (21,7 kb). Es liegt nahe, diese langen Fragmente den Genen in BR1 und BR2 zuzuordnen, da deren außergewöhnliche Größe und Aufbau aus repetitiven Untereinheiten bekannt sind. Letzteres ist höchstwahrscheinlich der Grund dafür, warum die Restriktionsenzyme in einem großen Teil der BR-Gene keine Erkennungssequenz vorfinden und deshalb überdurchschnittlich lange Genfragmente produzieren. In den EcoRI-, BamHI- und PstI-Verdauungen treten zusätzliche, kleinere Fragmente auf, deren Zuordnung wegen der Heterogenität der Hybridisierungsprobe ungewiß ist. Sie können von BR1 oder BR2 stammen, aber auch von BR6 oder dem Puff I17B.

Weitere Restriktionsenzyme, die die BR-Gene weitgehend intakt lassen, sind KpnI, HpaI, XhoI und SstI. Sie wurden in späteren Untersuchungen getestet (siehe Abb. 24). Alle diese Enzyme erkennen eine Sequenz von 6 Nucleotiden und sollten Fragmente von etwa 4000 bp Durchschnittslänge ergeben. Offenbar liegt die Größe der repetitiven Einheit der BR-Gene erheblich unter diesem Wert. Die Wahrscheinlichkeit für eine Fragmentierung der BR-Gene müßte daher zunehmen durch Anwendung von sogenannten "Kleinschneidern", d.h. Restriktionsenzymen, deren Erkennungssequenz aus nur 4 Nucleotiden besteht und die das Substrat in Stücke von 250 bp Durchschnittslänge zerlegen.

Die Spaltung der Genom-DNA mit AluI (Erkennungssequenz AG↓CT) resultiert in vielen, über den gesamten Größenbereich verteilten BR-Fragmenten (Abb. 12). Wahrscheinlich handelt es sich hier um unvollständige Verdauung. Das Ergebnis der Spaltung mit MboI (Erkennungssequenz ↓GATC) sind neben einer Anzahl schwächerer Banden 4 prominente BR-Fragmente von >21,7 kb, 4 kb, 0,25 kb und 0,15 kb (Abb. 12). Das hochmolekulare Fragment und die beiden kleinen Fragmente erwiesen sich als reproduzierbar, während das Auftreten des 4 kb Fragmentes von der Verwendung einer bestimmten Poly(A)$^+$-RNA

Präparation abzuhängen schien. Es wurde später nicht mehr gefunden. Das hochmolekulare BR-Fragment korrespondiert mit einer bei Ethidiumbromidfärbung sichtbaren Bande der MboI-verdauten Genom-DNA (Abb. 12).

Diese Bande, die im folgenden als MboI-1 bezeichnet wird, wandert im Gel in etwa mit dem EcoRI-Fragment A der λ-DNA und ist deutlich getrennt von den übrigen, wesentlich kleineren MboI-Fragmenten der Genom-DNA.

Das unerwartete Auftreten von Genfragmenten der Mindestgröße 21 kb nach Spaltung mit dem "Kleinschneider" MboI läßt zunächst an unvollständige Verdauung denken. Diese Möglichkeit wurde jedoch ausgeschlossen durch Verdauung eines Gemisches von C. tentans-DNA und dem Plasmid pBR322, dessen MboI-Fragmente aus der Literatur bekannt sind (Sutcliffe, 1979). Andere Erklärungen wären Inhibition des Restriktionsenzyms durch Modifikation der Erkennungssequenzen oder der Aufbau der Genfragmente aus tandemrepetitiven Einheiten relativ geringer Komplexität. Die zweite Möglichkeit erscheint als die wahrscheinlichere, da die repetitive Struktur der Gene in BR1 und BR2 schon seit längerem bekannt ist. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß auch DNA-Modifikation eine Rolle spielt.

Verschiedene Doppelverdauungen führten ebenfalls nicht zur Fragmentierung der langen BR-Moleküle. Abb. 13 zeigt als Beispiele die Doppelverdauungen mit EcoRI/PstI, HindIII/MboI und AluI/MboI. Die Spaltung HindIII/MboI ähnelt dem MboI-Profil; d.h. die hochmolekularen MboI-Fragmente enthalten keine interne Erkennungssequenz für HindIII. Mit AluI/MboI verschwinden lediglich die kleineren AluI-Fragmente, während die 3 größten AluI-Banden unverändert vorhanden sind.

Im Verlauf späterer Untersuchungen wurden 2 weitere "Kleinschneider" getestet, HaeIII und TaqI. Auch diese Enzyme greifen die BR-Gene nicht an (diese Daten sind nicht gezeigt).

Die Resistenz von BR-Genen auch gegen häufig schneidende Restriktionsenzyme lassen auf kurze repetitive Einheiten und auf unmittelbare Aneinanderreihung derselben ("tandem

Abb. 13: Speicheldrüsenspezifische Sequenzen nach Doppelverdauung der Genom-DNA mit 3 verschiedenen Kombinationen von Restriktionsenzymen. Hybridisiert wurde mit ^{125}J-Poly(A)$^+$-RNA ohne (links) und mit kompetierender "Rumpf"-RNA (rechts).
a) EcoRI + PstI; b) HindIII + MboI; c) AluI + MboI

repeats") in den Genen schließen. Wesentlich größer als 250 bp ist die repetitive Einheit vermutlich nicht. Wären diese Einheiten z.B. unter "unique" Sequenzen verstreut, so müßte man mehrere Restriktionsfragmente pro Gen erwarten. Da dies nicht zutrifft, liegen die "repeats" wahrscheinlich in tandemartiger Anordnung vor.

Die interne Struktur und die Größe der BR-Gene bedingen ihre Unzugänglichkeit für normale Restriktionsanalysen. Kartierung und damit Fragmentierung dieser Gene setzen offenbar Enzyme voraus, die innerhalb der repetitiven Einheit schneiden. Außerdem wird die Deutung von Restriktionsprofilen kompliziert durch die polyspezifische Hybridisierungsprobe, die nicht zwischen BR1 und BR2 unterscheidet.

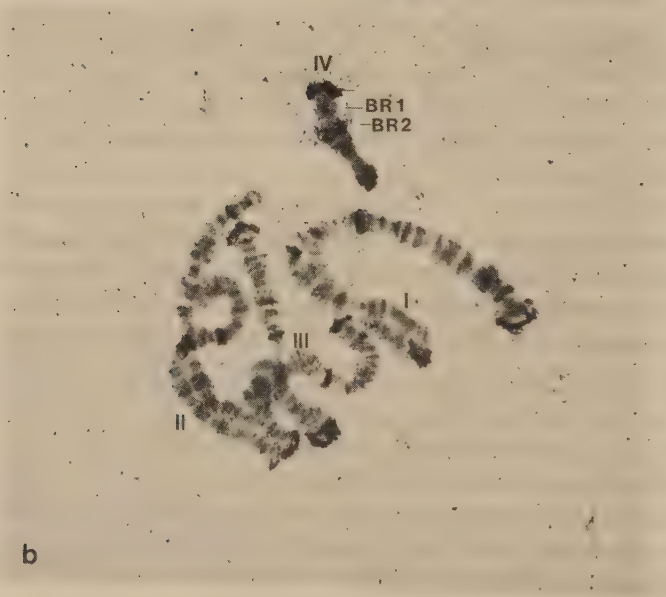
Ein anderer und auch direkterer Weg zur Strukturanalyse von BR-Genen wäre die Isolierung definierter Gensequenzen durch Klonierung in einem rekombinanten Plasmid.

Klonierung der Bande MboI-1

Zur Klonierung von BR-Sequenzen erschien die Bande MboI-1 aus folgenden Gründen geeignet: Das BR-Segment liegt in einem Gelbereich, der nach Anfärbung mit Ethidiumbromid deutlich als Bande erscheint und von der Menge der übrigen DNA im Gel getrennt ist. Auf Grund der Ethidiumbromidfluoreszenz läßt sich der DNA-Gehalt in dieser Bande auf etwa 0,5 - 1 % der gesamten, im Gel befindlichen DNA schätzen. Die BR-Gensequenzen, deren Anteil am Genom 0,04 % beträgt (Hollenberg, 1976; Wieslander, 1979) sollten in MboI-1 demnach um etwa 2 Größenordnungen angereichert sein. Wegen ihrer Größe ist außerdem zu erwarten, daß die BR-Fragmente in MboI-1 einen beträchtlichen Teil des Gens bzw. der Gene enthalten, was für spätere Analysen eines Klons günstig wäre. Die Stabilität derartig langer, repetitiver Sequenzen in E.coli kann allerdings nicht vorausgesetzt werden. Schließlich wurden MboI-Fragmente auch aus praktischen Erwägungen für die Klonierung ausgewählt. Das Enzym MboI produziert dieselben "sticky ends" wie das Restriktionsenzym BamHI, so daß die MboI-Fragmente ohne weitere Manipulationen in der einzigen BamHI-Sequenz der pBR-Plasmide kloniert werden können.

Zunächst wurden die DNA-Sequenzen in der Bande MboI-1 direkt analysiert durch In situ Hybridisierung. Dazu wurde die Bande präparativ aus einem Agarosegel isoliert und mit E. coli RNA-Polymerase in ^{3}H-cRNA umgesetzt. Mit zunehmender Expositionszeit wächst die Anzahl der markierten Chromosomenbereiche, was ein direktes Maß für die Komplexität der hybridisierenden Sequenzen ist. Zuerst findet sich Markierung sämtlicher Chromosomenenden (Telomeren) und aller Centromeren (Abb. 14a). MboI-1 dürfte also vorwiegend aus

IV
II
I
III
a


IV
BR1
BR2
I
III
II
b

den repetitiven Sequenzen des Centromeren- und Telomeren-heterochromatins bestehen. Ebenfalls recht schnell hybridisiert BR2, während schwache Markierung des BR1 erst nach Überexposition der Präparate zu sehen ist, zusammen mit vielen weiteren Markierungen auf allen Chromosomen (Abb. 14b).

Das wichtigste Ergebnis dieses Versuches ist zweifelsohne die fast ausschließliche Herkunft der BR-Fragmente in MboI-1 von BR2.

Beim Versuch einer etwas genaueren Größenbestimmung wurde festgestellt, daß die Fragmente in MboI-1 erheblich höhermolekular sind als zunächst vermutet. MboI-1 ist etwas kleiner als intakte λ-DNA (49 kb), aber deutlich größer als das 36 kb EcoRI-Fragment der mitochondrialen DNA von Hefe (Sanders et al., 1977). Man kann die C.tentans Fragmente also auf rund 40 kb schätzen. Damit besteht die Möglichkeit, daß sie das BR2-Gen in voller Länge enthalten.

Die präparative Isolierung von MboI-1 erfolgte durch Spaltung von 100 µg C. tentans-DNA mit MboI, Auftrennung der Fragmente in einem horizontalen Agarosegel und Elektrophorese der Bande in Hydroxyapatit (siehe Material und Methoden). Nach der Reinigung der DNA wurde das Vorhandensein der

---

Abb. 14: In situ Hybridisierung der Speicheldrüsenchromosomen von C. tentans mit den in ^{3}H-cRNA umgesetzten Restriktionsfragmenten in der Bande MboI-1. Die Hybridisierung erfolgte in 50 % Formamid - 5 x SSC - 10 mM PIPES (pH 6,8) für 16 Stunden bei 37°C mit 5×10^{4} cpm pro Präparat.
a) 1 Monat Exposition. Markiert sind die Telomeren (mit Ausnahme des linken Endes des Chromosoms II) und die Centromeren (mit Pfeilen gekennzeichnet). Das Chromosom IV ist heterozygot für eine lange Inversion, die von Bauer und Beermann (1952) beschrieben wurde. Vergrößerung 320fach. b) 4 Monate Exposition. Der BR2 ist deutlich markiert, sowie auch zahlreiche andere Orte auf den langen Chromosomen. Der rechte Arm des Chromosoms III ist nicht somatisch gepaart; im linken Arm des Chromosoms II verhindert eine Inversion die Paarung der beiden Homologen. Vergrößerung 320fach.

gesuchten Fragmente nachgewiesen durch Hybridisierung eines Teils der DNA mit ^{125}J-Poly(A)$^{+}$-RNA und Vergleich mit MboI-gespaltener Genom-DNA (Abb. 15). Die BR-Fragmente zeigen keine nennenswerte Degradation. Anschließend wurde das MboI-1 Präparat ligiert mit dem BamHI-verdauten, Phosphatase-behandelten Vektorplasmid pBR313 und das Ligationsgemisch in E. coli 490 transformiert. 245 Transfromanten (etwa 80 % der Gesamttransformanten) waren sensitiv gegen Tetracyclin, d.h. sollten Fremd-DNA integriert haben. Nach

Abb. 15:

Nachweis von 40 kb langen BR-Fragmenten in der präparativ isolierten Bande MboI-1. Ein Teil der MboI-1 Präparation (links) wurde mit MboI-verdauter Genom-DNA verglichen durch Transfer-Hybridisierung mit ^{125}J-Poly(A)$^{+}$-RNA.

der Koloniehybridisierung der Tc^{S}-Transformanten mit ^{125}J-Poly(A)$^{+}$-RNA zeigten 4 Klone eine positive Reaktion. Die Analyse ihrer Plasmide im Agarosegel führte zu dem Resultat, daß sie sich alle vier in der Größe nicht voneinander und überraschenderweise auch nicht vom Vektor unterscheiden (Abb. 21, Bahnen 1-4 und 9). Die rekombinanten Plasmide müssen daher ein sehr kleines Fragment integriert enthalten.

Der Versuch, die C. tentans-Insertion mit MboI spezifisch aus den rekombinanten Plasmiden auszuschneiden, mißlang auf Grund der, wie sich später herausstellte, nahezu vollständigen Inhibition des Enzyms MboI durch die E. coli-eigene Adenosin-Methylierung in der Erkennungssequenz, die sogenannte dam-Funktion (Dreiseikelmann et al., 1979). Das integrierte Fragment wurde deshalb zunächst unspezifisch ausgeschnitten mit HindIII und SalI (siehe Restriktionskarte in Abb. 23). Für beide Enzyme existiert jeweils nur eine Erkennungssequenz in pBR313 (und pBR322). Der Abstand zwischen beiden Erkennungssequenzen beträgt im Vektor 621 Nucleotide und in der Mitte dieses Fragmentes liegt die BamHI-Schnittstelle, in der die C. tentans-DNA kloniert wurde. Das kleine HindIII/SalI-Fragment ist in den 4 rekombinanten Plasmiden von identischer Größe und etwa 250 Basenpaare größer als das des Vektors (Abb. 22a, Bahnen 1-4 und 9). Weiterhin stellte sich heraus, daß alle 4 rekombinanten Plasmide von BamHI linearisiert werden. Bei der Klonierung entstand also eine Erkennungssequenz für BamHI, was bei der Verbindung von MboI- und BamHI-Fragmenten nicht notwendigerweise der Fall sein muß. Die Doppelverdauung mit HindIII und BamHI setzt aus dem Vektor ein kleines Fragment von 346 bp frei. Bei den rekombinanten Plasmiden ist das kleine HindIII/BamHI-Fragment wiederum identisch und etwa 150 bp größer als beim Vektor (Abb. 22b und Restriktionskarte in Abb. 23). Das Klonierungsexperiment mit den 40 kb BR-Fragmenten resultierte also in der Isolierung eines rund 150 bp langen BR-Fragmentes in 4 unabhängigen Fällen.

Auch die In situ Hybridisierung der rekombinanten Plasmide brachte ein unerwartetes Ergebnis. Die zur Klonierung verwendeten, langen BR-Fragmente stammen fast ausschließlich von BR2 (siehe Abb. 14). Die rekombinanten BR-Plasmide hybridisieren jedoch an den BR1 (Abb. 16a). Auf Grund dieser Spezifität wurden die BR-Plasmide als pCtBR1-1 bis 1-4 bezeichnet. Interessanterweise bleibt die Markierung aber nicht auf den BR1 beschränkt, sondern erfaßt nach längerer Exposition der Präparate auch sehr deutlich BR2 und schwach,

III
BR2
IV
BR1
II
a
II
III
I
BR6
BR1
BR2
IV
b

aber noch signifikant, BR6 (Abb. 16b). Die einzig mögliche Ursache dafür ist Kreuzhybridisierung und Voraussetzung dazu die Existenz von Sequenzhomologien zwischen BR1, BR2 und BR6, was bisher nicht berichtet wurde.

Daß die klonierten Fragmente Seqeunzen eines BR1-Gens enthalten müssen, geht bereits aus der Hybridisierung der rekombinanten E. coli-Kolonien mit Poly(A)$^+$-RNA hervor. Bestätigt wird dieser Befund durch In situ Hybridisierung von pCtBR1-1 ^{3}H-DNA an chromosomale Transkripte, eine Technik, die von Livak et al. (1978) für die Hitzeschock-Gene in Drosophila melanogaster angewendet wurde. Das rekombinante Plasmid hybridisiert spezifisch an Transkripte in der BR1-Region des Chromosoms IV (Abb. 17).

Die Passage von pCtBR1-1 durch den methylierungsdefekten E. coli-Stamm AB1157 (dam-4), d.h. die Transformation des Plasmids in diesen Stamm und seine erneute präparative Isolierung ermöglichte die Spaltung der nun unmethylierten Plasmid-DNA mit MboI, so daß die BR1-Insertion jetzt spezifisch ausgeschnitten werden sollte. Abb. 18b zeigt die MboI-Verdauung des aus E. coli AB1157 isolierten pCtBR1-1 im Vergleich zu pBR313 (Abb. 18a). Die Ethidiumbromidfärbung der DNA-Fragmente läßt keine Unterschiede zwischen Vektor und rekombinantem Plasmid erkennen. Die BR1-Insertion muß im Bereich der kleinsten noch sichtbaren Fragmente liegen, die aber in diesem Agarosegel (1,2 %) nicht mehr aufgetrennt werden und als diffuser Schmier erscheinen. Die Größenabschätzung anhand der bekannten MboI-Fragmente von pBR322 weist ebenfalls auf diese Region des Gels. Den Beweis er-

---

Abb. 16: In situ Hybridisierung von Speicheldrüsenchromosomen mit pCtBR1-1 ^{3}H-cRNA. Hybridisiert wurde in 50 % Formamid - 5 x SSC - 10 mM PIPES (pH 6,8) für 16 Stunden bei 37°C mit 10^5 cpm pro Präparat.
a) 1 Monat Exposition. Der BR1 ist spezifisch markiert. Vergrößerung 700fach. b) 3 Monate Exposition. Markierung ist erkennbar in BR1, BR2 und BR6. Vergrößerung 320fach.

Abb. 17: In situ Hybridisierung von pCtBR1-1 ^{3}H-DNA an wachsende, chromosomale Transkripte. Die Hybridisierung erfolgte in 50 % Formamid - 5 x SSC - 10 mM PIPES (pH 6,8) und 300 µg/ml gescherter Kalbsthymus-DNA für 16 Stunden bei 37°C mit 2 x 10^5 cpm pro Präparat. Spezifische Markierung ist in der BR1-Region des Chromosoms IV zu erkennen. Vergrößerung 700fach.

bringt die Hybridisierung dieser MboI-Verdauung mit ^{125}J-Poly(A)$^+$-RNA nach Transfer der DNA auf einen Nitrocellulosefilter (Abb. 18e). pCtBR1-1 zeigt eine einzige Bande in der Gegend zwischen 100 und 200 bp; pBR313 hybridisiert nicht mit Poly(A)$^+$-RNA (Abb. 18a).

Die Position des BR1-Fragmentes wird erkennbar nach Elektrophorese des MboI-gespaltenen pCtBR1-1 in 2 % Agarose (Abb. 19). Es wandert zusammen mit einer Mehrfachbande von Vektorfragmenten und wird von dieser nicht vollständig abgetrennt. Die Auftrennung gelingt erst in höherprozentigen Acrylamidgelen (Abb. 20).

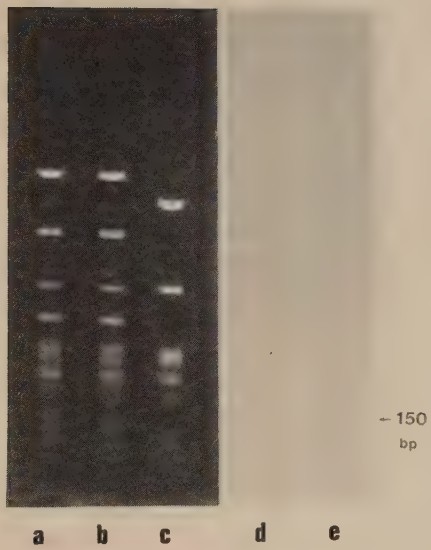


Abb. 18:

Verdauung von pCtBR1-1 mit MboI und Nachweis eines etwa 150 bp langen BR1-spezifischen MboI-Fragmentes durch Hybridisierung mit ^{125}J-Poly(A)$^+$-RNA.
a) pBR313 x MboI;
b) pCtBR1-1 x MboI;
c) pBR322 x MboI (Standardfragmente mit folgenden Längen: 1374, 665, 358, 341, 317, 272, 258, 207, 105, 91, 78 bp; Sutcliffe, 1978)
d) pBR313 x MboI, hybridisiert mit ^{125}J-Poly(A)$^+$-RNA;
e) pCtBR1-1 x MboI, hybridisiert mit ^{125}J-Poly(A)$^+$-RNA.

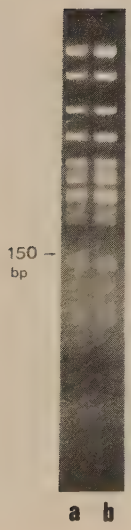


Abb. 19:

Verdauung von pCtBR1-1 und pBR313 mit MboI und Trennung der Restriktionsfragmente in einem hochprozentigen (2 %) Agarosegel.
a) pCtBR1-1; b) pBR313

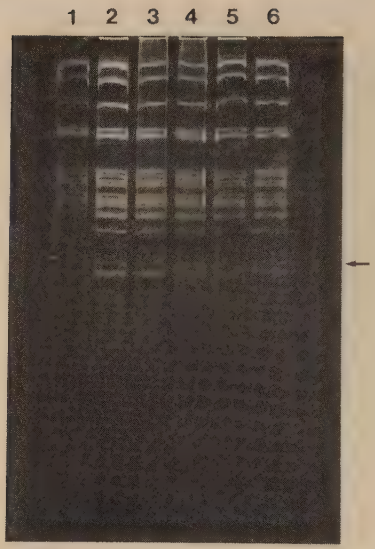


Abb. 20:

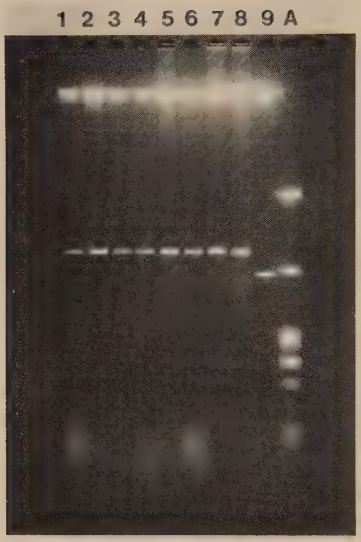
Abtrennung der BR1-spezifischen Insertion von Vektorfragmenten durch Elektrophorese der BR1-Plasmide in einem 8 % Acrylamidgel.
Bahn 1: pBR313 x MboI;
Bahn 2: pCtBR1-1 x MboI;
Bahnen 3-6: pCtBR1-5 bis pCtBR1-8 x Sau3A (Sau3A erkennt dieselbe Sequenz wie MboI, wird aber durch die E. coli-eigene Adenin-Methylierung nicht inhibiert).
Das BR1-Fragment ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Abb. 21:

Analyse der 8 unabhängig isolierten BR1-Plasmide durch Elektrophorese in 0,7 % Agarose. Die Gelbahnen 1-8 zeigen die rekombinanten Plasmide pCtBR1-1 bis pCtBR1-8 im Vergleich zu pBR313 (Bahn 9). Die am weitesten gewanderte Bande enthält die superhelicalen Ringformen der Plasmide, die anderen Banden enthalten offene Ringe, lineare Moleküle und Plasmid-Multimere.

Eine Wiederholung dieses Klonierungsexperimentes, wobei die präparative Isolierung der Bande MboI-1 über einen Saccharosegradienten erfolgte, ergab unter 219 Tc^S-Transformanten erneut 4 BR-Klone. Ihre Plasmide unterscheiden sich in der Größe nicht voneinander und auch nicht von den 4 BR1-Plasmiden der ersten Klonierung (Abb. 21). Die In situ Hybridisierung eines der rekombinanten Plasmide ergibt auch hier Markierung des BR1 und nach längerer Exposition ist Markierung des BR2 erkennbar. Daraufhin wurden die 4 Plasmide als pCtBR1-5 bis 1-8 bezeichnet.

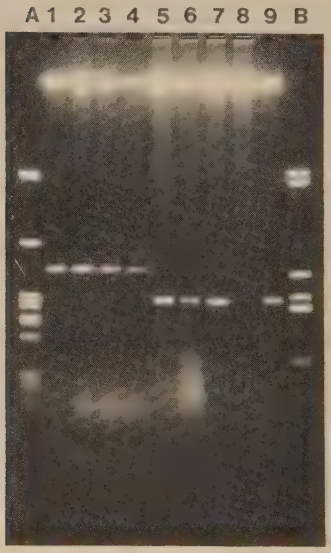
Die Restriktionskarten der BR1-Plasmide aus den beiden Klonierungen (Abb. 23) verdeutlichen die Ergebnisse der folgenden Doppelverdauungen. Während die Doppelverdauung mit HindIII/SalI bei sämtlichen BR1-Plasmiden dieselben Fragmente produziert (Abb. 22a), enthüllt die Doppelverdauung mit HindIII/BamHI Unterschiede zwischen den Plasmiden der ersten und zweiten Klonierung (Abb. 22b). In pCtBR1-1 bis pCtBR1-4 ist das kleine Fragment größer als das des Vektors, schließt also die BR1-Insertion mit ein. In pCtBR1-5 bis pCtBR1-7 hat das kleine Fragment dieselbe Größe wie in pBR313 und enthält somit nur Vektorsequenzen. Eine einfache Erklärung dafür ist die unterschiedliche Orientierung des BR1-Fragmentes in diesen beiden Plasmidgruppen, wie sie in Abb. 23 dargestellt wird. Bei Doppelverdauung mit BamHI/SalI sollten dann die umgekehrten Restriktionsprofile auftreten, d.h. das kleine Fragment von pCtBR1-5 bis 1-7 müßte die BR1-Insertion enthalten, bei pCtBR1-1 bis 1-4 dagegen identisch mit dem des Vektors sein. Dies ist auch tatsächlich der Fall (Abb. 22c). pCtBR1-8 zeigt sowohl bei HindIII/BamHI- als auch bei BamHI/SalI-Verdauung nur 1 großes Fragment im Gel. Daraus folgt, daß dieses Plasmid keine BamHI-Sequenz mehr enthält (siehe Abb. 22c, Bahn X) und lediglich durch HindIII bzw. SalI linearisiert wird. Die korrespondierende MboI-Sequenz ist jedoch noch vorhanden, denn das BR1-Fragment kann mit MboI aus pCtBR1-8 ausgeschnitten werden und unterscheidet sich in der Größe nicht von dem der anderen 7 Plasmide (Abb. 20, Bahn 6).



a

Abb. 22:

Doppelverdauungen der 8 BR1-Plasmide mit HindIII + SalI (a), HindIII + BamHI (b) und BamHI + SalI (c). Die Gelbahnen 1-8 enthalten die Plasmide pCtBR1-1 bis pCtBR1-8, Bahn 9 den Vektor pBR313. Als Größenstandards wurden folgende Fragmente verwendet: pBR322 x MboI in den mit A bezeichneten Bahnen (1374, 665, 358, 341, 317, 272, 258, 207, 105, 91, 78 bp; Sutcliffe, 1978); Bahn B: pBR322 x TaqI (1444, 1307, 475, 368, 315, 312, 141 bp; Sutcliffe, 1978); Bahn C: SV40 x HindIII (1768, 1169, 1095, 526, 447, 215 bp; Fiers et al., 1978). Bahn X in Abb. 22c enthält das mit BamHI behandelte Plasmid pCtBR1-8. Das Plasmid zeigt die beiden Ringformen, wird also von BamHI offensichtlich nicht geschnitten.



b

c

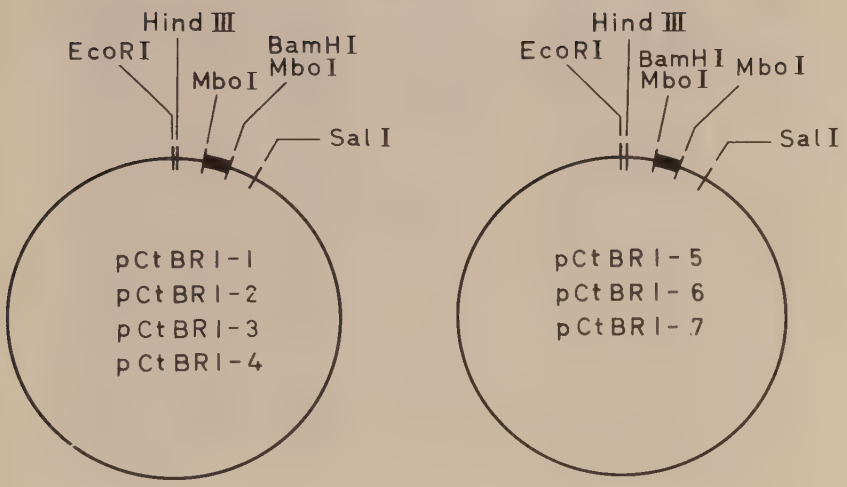


Abb. 23: Partielle Restriktionskarten der Plasmide pCtBR1-1 bis pCtBR1-7 zur Erläuterung der beiden möglichen Orientierungen des BR1-Fragmentes im Vektor. Die im BamHI-Ort von pBR313 integrierte BR1-Sequenz ist durch einen dick gezeichneten Abschnitt hervorgehoben, die dünnere Linie repräsentiert pBR313. Die Größenverhältnisse zwischen Vektor und Fremd-DNA sind im Maßstab dargestellt.

Für die Klonierung eines wesentlich kleineren DNA-Fragmentes als ursprünglich kloniert werden sollte, gibt es 2 Erklärungsmöglichkeiten. Es wäre vorstellbar, daß große Teile einer repetitiven Fremd-DNA, wie z.B. der BR-DNA, während der Vermehrung in E. coli durch intra- und intermolekulare Rekombination eliminiert werden. Die zweite Möglichkeit ist Kontamination der präparativ isolierten 40 kb Fragmente mit kleineren Genomfragmenten und Klonierung der Kontaminanten. Im Prinzip sollte die Herkunft der klonierten Fragmente durch Rückhybridisierung auf Genom-DNA relativ einfach festzustellen sein und würde dann eine der genannten Möglichkei-

ten ausschließen. Dieser Test führte aber hier zunächst nicht weiter, da die BR1-Plasmide dieselben Genomfragmente markieren wie die Poly(A)$^+$-RNA (siehe nächster Abschnitt). Es gibt jedoch 2 Befunde, die gegen die Eliminationshypothese sprechen, nämlich die Zugehörigkeit der 150 bp und der 40 kb BR-Fragmente zu verschiedenen Balbianiringen und die Klonierung von identisch großen Fragmenten in 8 unabhängigen Fällen. Es ist unwahrscheinlich, daß bei Instabilität klonierter Sequenzen immer das gleiche Endfragment übrig bleibt. Die Möglichkeit einer Klonierung von Kontaminanten findet dagegen Unterstützung durch die Existenz eines größenidentischen (150 bp) BR-Fragmentes in der MboI-verdauten Genom-DNA. Da bei der Vermehrung in E. coli und vor allem bei der Transformation kleine Plasmide extrem stark selektiert werden, könnten auch winzige Mengen von kontaminierenden 150 bp Genomfragmenten für die Klonierung der kleinen BR1-Stücke verantwortlich sein.

Hybridisierung von pCtBR1-1 mit Genom-DNA

Anhand von "Southern blots" der Genom-DNA wurde die Hybridisierung von pCtBR1-1 mit der von Poly(A)$^+$-RNA verglichen (Abb. 24). Enzyme, die nach Hybridisierung mit Poly(A)$^+$-RNA nur einheitliche, sehr große Fragmente produzieren, zeigen erwartungsgemäß dasselbe Ergebnis mit pCtBR1-1, z.B. HindIII, EcoRI, PstI, KpnI, HhaI, HpaI, XhoI und SstI.

Der Vergleich der Mbol-Verdauung wurde bereits erwähnt. Poly(A)$^+$-RNA und pCtBR1-1 hybridisieren an dieselben chromosomalen Fragmente (Abb. 24). Die starke Markierung von MboI-1 durch pCtBR1-1 ist auf Grund der Resultate aus den In situ Hybridisierungen als Kreuzhybridisierung zwischen verschiedenen Genen zu interpretieren. Die Sequenzhomologien zwischen beiden Balbianiringen scheinen doch sehr beträchtlich zu sein, denn die Markierung von MboI-1 bleibt auch unter strengeren Hybridisierungsbedingungen (42^{o}C statt 37^{o}C) bestehen. Ein mehr oder weniger deutlicher, quantitativer Unterschied zwischen beiden Hybridisierungsproben tritt mit

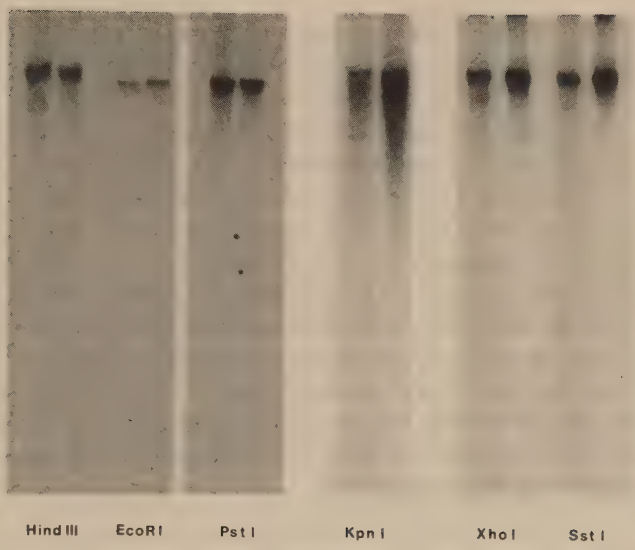


Abb. 24:

Vergleich der zu Poly(A)$^+$-RNA aus Speicheldrüsen und zu pCtBR1-1 homologen Restriktionsfragmente in der Genom-DNA von C.tentans. 6 µg DNA wurden mit den angeführten Restriktionsenzymen verdaut und das Verdauungsgemisch dann auf 2 Gelbahnen verteilt. Nach den Transfer wurde die eine Bahn hybridisiert mit ^{125}J-Poly(A)$^+$-RNA (links), die andere mit pCtBR1-1 ^{32}P-DNA (rechts).

den kleinen BR-Fragmenten auf. Während Poly(A)$^+$-RNA an beide Fragmente etwa gleich stark hybridisiert, wird das 150 bp Fragment von pCtBR1-1 in manchen Fällen stärker markiert als das 250 bp Fragment. Möglicherweise ist dieser Befund ein Hinweis darauf, daß im 150 bp Fragment die eigentliche, exakt homologe Sequenz zu den klonierten BR1-Stücken zu suchen ist. Später bestätigte sich diese Vermutung. Unter sehr strengen Bedingungen (50 % Formamid, 5 x SSC, 50°C) hybridisiert pCtBR1-1 ausschließlich mit dem 150 bp Genomfragment. Dieses enthält also höchstwahrscheinlich die BR-Sequenz, die tatsächlich kloniert wurde, und sie repräsentiert das BR1-Gen. Daraus folgt, daß MboI ein 40 kb langes Gen in identische Fragmente von 150 bp zerlegt und daß die klonierte Sequenz die repetitive Untereinheit des BR1-Gens oder einen Teil derselben darstellt.

Die Nucleotidsequenz des BR1-Fragmentes in pCtBR1-1

Die Strategie zur Sequenzierung des BR1-Fragmentes stützt sich auf die Kenntnis der Restriktionsorte von pBR322 (Sutcliffe, 1979), die in diesem Teil des Plasmids mit denen von pBR313 übereinstimmen. Nach dem in Abb. 25 dargestellten Schema wurde in 2 verschiedenen Versuchsansätzen die Nucleotidsequenz beider DNA-Stränge bestimmt. Jeweils 100 µg pCtBR1-1 wurden mit HindIII + SalI bzw. HindIII + BamHI doppelverdaut und die kleinen Fragmente, die die BR1-Insertion enthalten, über einen Saccharosegradienten präparativ isoliert. Das Hind/Sal-Fragment wurde weiterverdaut mit TaqI, das größere der beiden Fragmente aus einem Agarosegel präparativ isoliert und mit ^{32}P-ATP am 5'-Ende radioaktiv markiert. Nach der Spaltung mit BamHI wurde das Verdauungsgemisch in einem 5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt und das kleinere der beiden Fragmente aus dem Gel elektroeluiert. Dieses TaqI/BamHI Fragment wurde für die Basenreaktionen nach Maxam und Gilbert (1977) verwendet. Zur Sequenzierung des komplementären Stranges wurde das aus dem Saccharosegradienten präparativ isolierte HindIII/BamHI Fragment 5'-endmarkiert, dann mit TaqI gespalten und das kleinere der

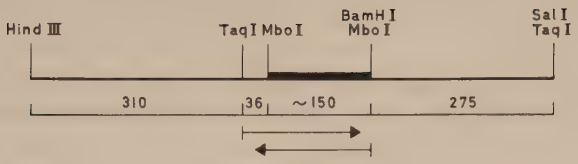


Abb. 25: Ausschnitt aus dem Plasmid pCtBR1-1 zur Erläuterung der Sequenzierungsstrategie. Die Restriktionskarte zeigt das BR1-Fragment (dick eingezeichnet), flankiert von den durch die HindIII- und SalI-Orte begrenzten Vektorsequenzen (dünne Linie). Die Längen der verschiedenen Restriktionsfragmente sind unterhalb der Karte in bp aufgeführt (entnommen aus dem korrespondierenden Bereich von pBR322; Sutcliffe, 1979). Die Pfeile geben die Sequenzierungsrichtungen an, wobei der senkrechte Strich am Pfeilende die 5'-Endmarkierung mit ^{32}P-ATP bedeutet.

beiden Fragmente aus einem Acrylamidgel isoliert wie oben erwähnt und für die Sequenzierung verwendet. Es wurde also in beiden Fällen das gleiche Restriktionsfragment sequenziert; in einem Fall lag die 5'-Endmarkierung am TaqI-Ende, im anderen Fall am BamHI-Ende.

Abb. 26 zeigt die Nucleotidsequenz des BR1-Fragmentes. Die vom Plasmidvektor stammenden 36 bp zwischen dem TaqI-Ende und dem Integrationsort des BR1-Fragmentes sind identisch mit der von Sutcliffe (1979) publizierten Sequenz in pBR322 und wurden hier nicht mit aufgeführt. Das BR1-spezifische Fragment ist 147 bp lang und hat einen G+C-Gehalt von 44 %. Dieser Wert stimmt recht gut überein mit dem von Eström und Beermann (1962) gemessenen G+C-Gehalt von 43,8 % für BR1-RNA. Sehr wichtig für weitere Untersuchungen ist das Auftreten von Erkennungssequenzen für 4 Restriktionsenzyme: Je eine Sequenz für MboII, HinfI und PvuII und 2 Schnittstellen für AluI, von denen eine mit der PvuII-Seuqenz zusammenfällt. Die Restriktionskarte des BR1-Fragmentes ist in Abb. 26 schematisch dargestellt.

```
MboI
GA TCT AAA CCT AGA CCA GAG AGA TGC GGT AGT GCA ATG AGA AAG ACT   47
   Ser Lys Pro Arg Pro Glu Arg Cys Gly Ser Ala Met Arg Lys Thr

  AluI                        MboII           HinfI
GAA GCT GAA AAA TGT GCT AGA AGA AAT GGT AGA TTC AAT GCC AGT   92
Flu Ala Glu Lys Cys Ala Arg Arg Asn Gly Arg Phe Asn Ala Ser

                      PvuII
                      AluI
AAA TGC AGA TCT GCT TCA GCT GGT AAA CCA AGC AGA AAA TCC GAA   137
Lys Cys Arg Cys Ala Ser Ala Gly Lys Pro Ser Arg Lys Ser Glu

                MboI
CCT AGC AAG GGA TC
Pro Ser Lys Gly Ser
```

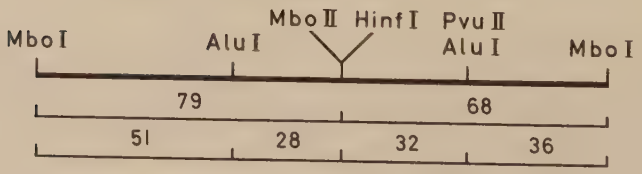


Abb. 26: Nucleotidsequenz (oben) und schmatische Darstellung (unten) der BR1-spezifischen Insertion in pCtBR1-1. Es ist derjenige DNA-Strang in 5'-3'-Richtung gezeigt, der wahrscheinlich dem der mRNA entspricht. Die Aminosäuren, die sich aus dem einzig offenen Leseraster dieses Stranges ableiten lassen, sind unterhalb der DNA-Sequenz angegeben. Restriktionsorte sind durch Striche über der DNA-Sequenz gekennzeichnet. Die Nummerierung der Basen erfolgt vom Nucleotid G des 5'-MboI-Ortes an.
Die Abstände zwischen einzelnen Restriktionsorten sind unterhalb der Restriktionskarte in bp angegeben.

Außer der mehrfach auftretenden Basenfolge $(G(A)_n$, wobei n = 2-5, und der direkten Wiederholung des Heptamers AACCTAG (Positionen 7-13 und 136-142) finden sich keine strukturellen Besonderheiten. Von den insgesamt 6 möglichen Leserastern sind nur 2 offen, nämlich 1 Leseraster in jeder der beiden Orientierungen. Die in Abb. 26 dargestellte Orientierung wurde aus dem Grunde bevorzugt, weil die sich aus ihr ergebende Aminosäuresequenz eine recht gute Übereinstimmung zeigt mit der von Großbach (1969) bestimmten Aminosäurezusammensetzung der Gesamt-Speichelproteine von C. tentans. Nach Großbach besteht der Speichel zu mehr als 60 % aus 6 überdurchschnittlich häufig vorkommenden Aminosäuren, nämlich Arginin, Lysin, Glutaminsäure, Cystein, Serin und Alanin. Tabelle 2 vergleicht die Häufigkeiten dieser 6 Aminosäuren im Gesamtspeichel und in den beiden offenen Leserastern des BR1-Fragmentes. Daraus geht klar hervor, daß nur einer der Leseraster sich mit Großbachs Daten vereinbaren läßt. Das aus dem komplementären Strang abgeleitete Peptid enthält weder Arginin noch Lysin und Cystein, dagegen aber 32 % Leucin. Der Anteil dieser Aminosäure im Speichel beträgt nach Großbach jedoch nur 2 %.

Die Aminosäuresequenz Arg-Cys-Gly-Ser-Ala (Nucleotide 21-35) wiederholt sich als Arg-Cys-Ala-Ser-Ala (Nucleotide 99-113), desgleichen die Sequenz Arg-Lys-Thr-Glu (Nucleotide 39-50) als Arg-Lys-Ser-Glu (Nucleotide 126-137). Die Austausche Gly/Ala und Thr/Ser betreffen funktionell gleiche Aminosäuren, so daß man hinter dem zweimaligen Auftreten dieser Peptide eine Gesetzmäßigkeit vermuten könnte.

Weitere Struktureigentümlichkeiten lassen sich auch auf Aminosäureniveau aus dieser DNA-Sequenz nicht ableiten.

Tabelle 2: Häufigkeiten der 6 vorherrschenden Aminosäuren in den Gesamt-Speichelproteinen von C. tentans und in den aus beiden DNA-Strängen des sequenzierten BR1-Fragmentes abgeleiteten Peptiden. Die für den C. tentans Speichel angegebenen Grössen sind Mittelwerte der 5 verschiedenen Analysen von Großbach (1969).

Aminosäure	Prozentuale Anteile der Aminosäuren in Polypeptiden aus		
	Gesamtspeichel	BR1-Fragment, wahrscheinlicher Sinn-Strang	BR1-Fragment, wahrscheinlicher Antisinn-Strang
Arg	12,5	18,0	0
Lys	13,0	14,0	0
Glu	12,4	8,0	2,0
Cys	12,4	8,0	0
Ser	12,9	14,0	8,0
Ala	9,4	12,0	10,0

Restriktionskartierung von BR-Genen

Die in der Nucleotidsequenz des BR1-Fragmentes vorgefundenen Restriktionsorte ermöglichten die Analyse des intakten BR1-Gens durch Verdauung von Genom-DNA mit den betreffenden Enzymen und Hybridisierung mit pCtBR1-1. Sehr wichtig für die Interpretation der Ergebnisse ist dabei die schon mehrfach erwähnte, signifikante Sequenzhomologie zwischen pCtBR1-1 und dem BR2-Gen. Die folgenden Hybridisierungen kartieren also gleichzeitig 2 verschiedene Gene, BR1 und BR2.

Die Daten für das BR1-Gen sind in Form einer Restriktionskarte der repetitiven Untereinheit in Abb. 28 zusammengefaßt.

Die Herkunft des klonierten Fragmentes aus einem repetitiven Teil des BR1-Gens wurde bereits aus mehreren Daten gefolgert. Anwendung der die klonierte Sequenz schneidenden Restrik-

tionsenzyme sollte demnach zu einer Fragmentierung des BR1-Gens führen. Diese Annahme trifft zu. Mit den Enzymen MboII und HinfI kommt die Größenreduktion am drastischsten zum Ausdruck (Abb. 27 c,d). Die Hybridisierung im Größenbereich von 40 kb bis 1 kb ist vernachlässigbar; die Hauptmenge konzentriert sich auf ein Fragment von etwa 240 bp Länge. Die HinfI-Verdauung zeigt außerdem noch ein kleineres Fragment von etwa 140 bp. Demnach kann kein Zweifel mehr darüber bestehen, daß das 147 bp BR1-Fragment aus der repetitiven Untereinheit des BR1-Gens stammt. Sicher ist auch die völlige Zerstückelung nicht nur des BR1-, sondern auch des BR2-Gens durch MboII und HinfI. Bedeutung und Zuordnung der prominenten BR-Fragmente lassen sich aus diesen beiden Verdauungen allein jedoch nicht ableiten.

Hier hilft die Restriktion mit PvuII (Abb. 27e) weiter. Dieses Enzym ergibt BR-Fragmente in beiden Größenextremen (ähnlich MboI), nämlich ca. 40 kb und 240 bp. Das 240 bp Fragment muß auf Grund des in der klonierten Sequenz nachgewiesenen Restriktionsortes für PvuII von BR1 stammen. Die 40 - 50 kb langen PvuII-Fragmente repräsentieren dann das BR2-Gen, das offenbar keine interne Erkennungssequenz für PvuII enthält. Mit großer Wahrscheinlichkeit enthält das 240 bp PvuII-Fragment die intakte, repetitive Untereinheit des BR1-Gens. Dafür spricht auch das Ergebnis einer MboI/MboII-Doppelverdauung (siehe unten), das die Zugehörigkeit auch der 240 bp MboII-Fragmente zu BR1 sichert. Die Spaltung des BR1-Gens in 240 bp Fragmente durch 2 verschiedene Restriktionsenzyme läßt sich am einfachsten mit 1 Schnitt pro Untereinheit erklären.

Eine Länge von 240 bp für die repetitive Untereinheit von BR1 wird auch durch die Verdauung mit AluI unterstützt. Das klonierte BR1-Fragment enthält 2 AluI-Sequenzen im Abstand von 60 bp. Nimmt man 2 AluI-Schnitte pro Untereinheit an, so sollten sich 2 BR1-Fragmente mit den Längen 180 bp und 60 bp ergeben. Das 60 bp Fragment ist mit der Southern-Technik nicht mehr nachweisbar. Ein Fragment von etwa 180 bp jedoch ist in der AluI-Verdauung (Abb. 27k) tatsächlich vor-

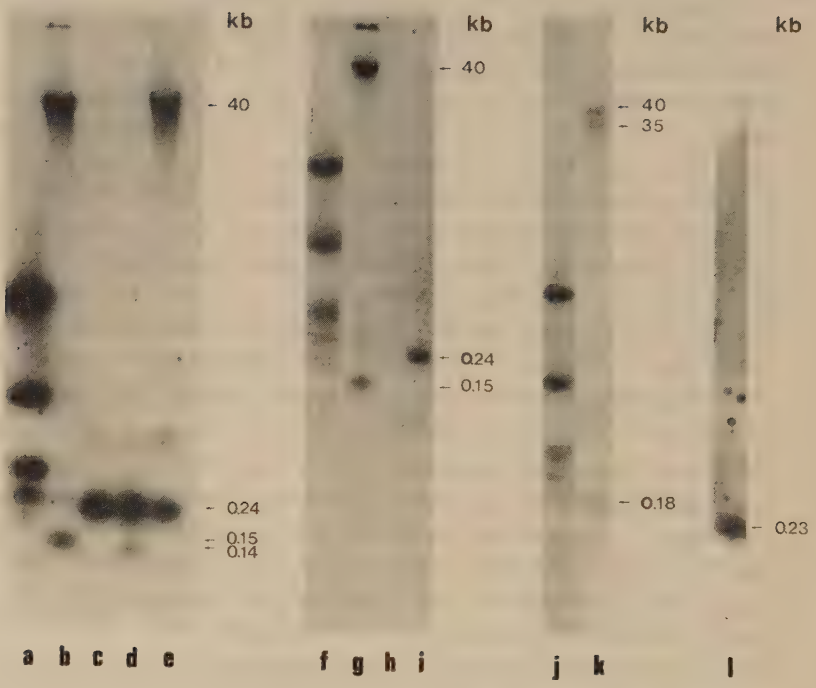


Abb. 27: Restriktionskartierung von BR-Genen in der Genom-DNA. Nach Transfer auf Cellulosenitratfilter wurden die Restriktionsfragmente hybridisiert mit pCtBR1-1 ^{32}P-DNA. Die Verdauungen in f)-i) wurden in 1,7 % Agarose aufgetrennt, alle anderen in 1 % Agarose.
a), f), j) enthalten die MboI-Fragmente von pBR322 als Größenstandards (die Längen sind in der Legende zu Abb. 22 aufgeführt); b), g) MboI; c) MboII; d) HinfI; e) PvuII; h) MboI + MboII; i) MboI + HinfI; k) AluI; l) MboII + HinfI.

handen. Das Grundelement des BR1 wird also von AluI 2 mal geschnitten und die Bruchstücke addieren sich zu 240 bp. Die 2 großen AluI-Fragmente stammen wahrscheinlich von BR2.

Für MboI scheinen ebenfalls 2 Erkennungssequenzen pro Einheit vorzuliegen. Das größere Fragment hat eine Länge von 147 bp und wurde durch Klonierung isoliert. Es müßte noch ein weiteres Fragment von 93 bp vorhanden sein. Dieses Fragment wurde aber in der Genom-DNA nicht entdeckt. Mit pCtBR1-1 kann es wegen fehlender Sequenzhomologie höchstwahrscheinlich überhaupt nicht hybridisieren. Mit Poly(A)$^+$-RNA sollte es aber bei effizienter Hybridisierung gerade noch nachweisbar sein. Daß dieses Fragment nicht gefunden wurde, kann verschiedene Ursachen haben. In einigen Experimenten war es vermutlich bereits aus dem Gel gelaufen. Für die optimale Hybridisierung spielen die Menge der eingesetzten DNA, die Effizienz des Transfers und die Qualität der RNA-Präparation eine Rolle. Die wirkungsvollste Kombination all dieser Bedingungen war bei den Hybridisierungen mit Poly(A)$^+$-RNA wahrscheinlich nicht gegeben. Für die MboI-Verdauung in Abb. 24 z.B. wurden nur 3 µg DNA eingesetzt, und in diesem Fall ist der Nachweis eines so kleinen Fragmentes mit der Southern-Technik kritisch. Außer durch methodische Unzulänglichkeiten wäre das Fehlen des 93 bp Fragmentes aber auch mit der Struktur des Objekts selbst zu erklären, nämlich der Existenz einer dritten MboI-Erkennungssequenz innerhalb der 93 bp.

Die Herkunft der 240 bp MboII-Fragmente von BR1 wird bestätigt durch Doppelverdauung der Genom-DNA mit MboI und MboII (Abb. 27h). Das 147 bp BR1-Fragment hat eine Erkennungssequenz für MboII und sollte von diesem Enzym in 2 Fragmente von 79 bp und 68 bp Länge gespalten werden. Die Doppelverdauung zeigt eine sehr schwache Bande im Größenbereich von 80 bp. Das 68 bp Fragment ist nicht mehr feststellbar. Größere BR-Fragmente treten in dieser Doppelverdauung nicht auf. Daraus folgt, daß die 40 kb BR2-Fragmente in der Bande MboI-1 von MboII in kleine, nicht mehr nachweisbare Stücke zerlegt werden. Wahrscheinlich hat die repetitive Unterein-

heit des BR2-Gens mehr als eine Erkennungssequenz für MboII, während das BR1-Gen nur einmal pro Einheit von MboII geschnitten wird.

Die Verdauung mit HinfI ergab 2 prominente BR-Fragmente, 240 und 140 bp lang. Bei Doppelverdauung mit MboI und HinfI gilt für das 147 bp BR1-Fragment dasselbe wie bei MboII: HinfI schneidet einmal in dieser Sequenz und zwar an derselben Stelle wie MboII und führt dadurch zu den beiden genannten Fragmenten von 79 bp und 68 bp. Das größere dieser beiden Fragmente scheint in der MboI/HinfI-Doppelverdauung (Abb. 27i) vorhanden zu sein. Im Gegensatz zur MboI/MboII-Doppelverdauung tritt hier jedoch ein Fragment von 240 bp auf. Da das BR1-Gen von MboI bereits in mindestens 2 kleine Bruchstücke (147 bp und 93 bp) geschnitten wird, muß dieses 240 bp Fragment aus den 40 kb langen Molekülen der Bande MboI-1 und damit von BR2 stammen. HinfI spaltet also die repetitive Einheit des BR2-Gens und diese hat eine ähnliche Größe wie die des BR1-Gens. Aus der Zuordnung der 240 bp HinfI-Fragmente zu BR2 folgt die Herkunft der 140 bp HinfI-Fragmente von BR1. Dies bedeutet die Existenz von mindestens 2 Erkennungssequenzen für HinfI in der Untereinheit von BR1. Da die sequenzierten 147 bp nur einen HinfI-Restriktionsort enthalten, müssen die zusätzlichen HinfI-Sequenzen in dem die vollständige Einheit ergänzenden MboI-Fragment von 93 bp lokalisiert sein. Unter Berücksichtigung des 140 bp Fragmentes müßte bei 2 HinfI-Schnitten pro Einheit ein zweites Fragment von 100 bp postuliert werden. Da ein solches in der HinfI-Verdauung der Genom-DNA nicht auftritt, existiert wahrscheinlich eine dritte HinfI-Sequenz innerhalb der Untereinheit, durch die das 100 bp Fragment noch weiter verkleinert wird.

Abb. 28 zeigt die Zusammenfassung dieser Daten in Form einer schematischen Darstellung der Restriktionskarte der 240 bp BR1 "repeat".

Ein mit den bisher diskutierten Genen nicht erklärbares Ergebnis brachte die Doppelverdauung mit MboII/HinfI (Abb. 27l).

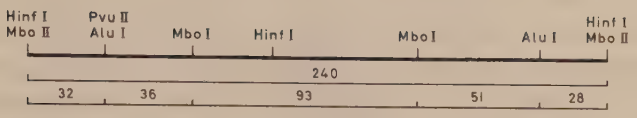


Abb. 28: Darstellung der vorläufigen Restriktionskarte einer 240 bp Repetitionseinheit in einem BR1-Gen. Wegen des einzigen MboII-Schnittes in dieser Einheit wurde die Karte auf den MboII-Restriktionsort bezogen. Die Größen der Restriktionsfragmente sind unterhalb der Karte in bp angegeben. Die 93 bp zwischen den beiden MboI-Orten sind in der klonierten BR1-Sequenz nicht enthalten. Der in dieses Segment eingezeichnete HinfI-Ort wurde aus dem Auftreten eines 140 bp BR1-Fragmentes nach Spaltung der Genom-DNA mit HinfI abgeleitet (siehe Abb. 27d). Vermutlich kommen in dem 93 bp Fragment aber noch ein weiterer HinfI- und ein MboI-Ort vor.

Für das BR1-Gen wäre als einziges nachweisbares Produkt dieser Doppelverdauung ein Fragment von 140 bp zu erwarten. Da nämlich der einzige MboII-Schnitt in der Untereinheit des BR1-Gens zusammenfällt mit einem der 2 bzw. 3 HinfI-Schnitte, sollte die MboII/HinfI-Doppelverdauung dasselbe ergeben wie eine HinfI-Einfachverdauung, also ein Fragment von 140 bp. Das kreuzhomologe BR2-Gen wird von HinfI in ein Fragment von 240 bp geschnitten, von MboII aber noch weiter in nicht mehr nachweisbare Fragmente zerkleinert. Das überraschende Resultat der MboII/HinfI-Doppelverdauung ist das Auftreten eines relativ stark markierten BR-Fragmentes von etwa 230 bp, zusätzlich zum erwarteten 140 bp BR1-Fragment. Die Herkunft des 230 bp Fragmentes von BR6 ist unwahrscheinlich, da die Hybridisierung bei 42°C durchgeführt wurde und pCtBR1-1 bei dieser Temperatur - zumindest bei In situ Hybridisierung - zu BR6 keine Homologien mehr zeigt (siehe Abb. 34). Das 230 bp Fragment sollte daher ein weiteres, bisher nicht er-

wähntes Gen repräsentieren, dessen Sequenz recht eng mit pCtBR1-1 verwandt ist (siehe Diskussion).

In den Verdauungen mit MboI, MboII, HinfI und PvuII traten neben den oben diskutierten Hauptfragmenten auch reproduzierbar schwächer hybridisierende, größere BR-Fragmente auf. Ihre Herkunft kann mit den vorliegenden Daten nicht erklärt werden. Die schwache Hybridisierung bedeutet entweder wenig Sequenzhomologie mit pCtBR1-1 oder das Vorkommen dieser Fragmente in nicht äquimolaren Mengen. Es könnte sich um Fragmente des BR1-Gens handeln, die aber nur in einem sehr kleinen Teil mit pCtBR1-1 homolog sind. Möglich wäre auch die Herkunft dieser Fragmente aus allelischen Varianten des BR1- oder BR2-Gens oder sogar aus anderen BR-Genen (siehe Diskussion).

Die repetitive Substruktur der BR-Gene

Die Spaltung des 40 kb großen BR1-Gens in 240 bp Fragmente durch die Enzyme MboII und PvuII identifiziert mit hoher Wahrscheinlichkeit die repetitive Einheit des Gens. Falls die einzelnen Elemente in tandemartiger Anordnung vorliegen, sollten unvollständige Verdauungen mit den oben genannten Enzymen zu Serien von Fragmenten führen, die sich jeweils um die Größe der repetitiven Einheit unterscheiden.

Abb. 29a zeigt eine Folge partieller Verdauungen von Genom-DNA mit MboII, wobei die Menge an Enzym bis hin zur vollständigen Spaltung gesteigert wurde. Die Größenabstufungen der partiell verdauten Produkte folgen eindeutig einer Gesetzmäßigkeit. Was auffällt, ist die Abwechslung zwischen stärker und schwächer hybridisierenden Fragmenten. Es liegt nahe, diese Fragmente 2 verschiedenen Serien zuzuordnen und im Hinblick auf die Hybridisierungseigenschaften von pCtBR1-1 die stark markierten Fragmente auf BR1, die schwächer markierten auf ein verwandtes Gen zurückzuführen. Die stark markierten Fragmente unterscheiden sich in der Größe um jeweils 240 bp, wie es für BR1-Fragmente zu erwarten wäre. Die Größendifferenzen zwischen den schwächer hybridisieren-

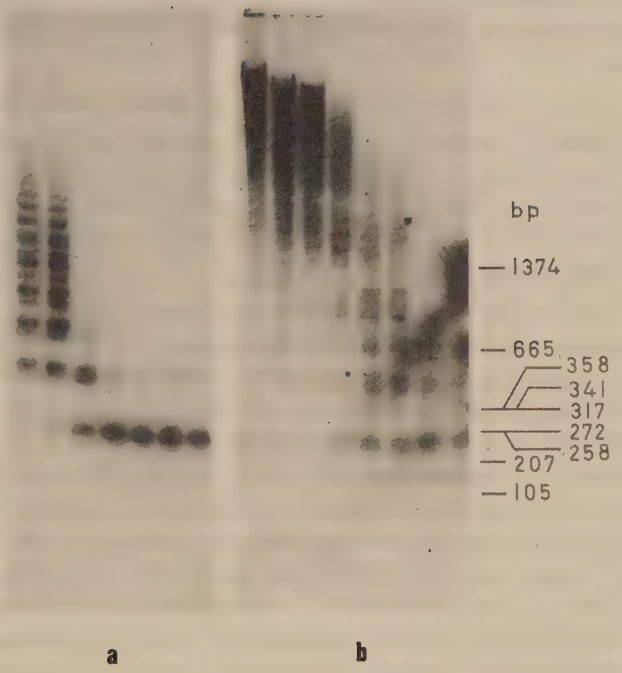


Abb. 29: Demonstration der repetitiven Struktur von BR-Genen durch partielle Verdauungen mit Restriktionsenzymen, die innerhalb der repetitiven Untereinheit spalten. Jeweils 10 µg Genom-DNA wurden mit gesteigerten Mengen an Enzym behandelt, bis hin zur vollständigen Verdauung. Nach dem Transfer wurden die Restriktionsfragmente hybridisiert mit pCtBR1-1 ^{32}P-DNA. Größenstandards sind die MboI-Fragmente von pBR322. a) partielle MboII-Verdauungen b) partielle HinfI-Verdauungen.

den Fragmenten betragen 220 - 230 bp. Die Zuordnung dieser Serie zum kreuzhomologen BR2-Gen ist problematisch insofern, als dieses BR2-Gen, wie im vorangegangenen Abschnitt erörtert, von MboII offenbar mehrmals pro Untereinheit geschnitten wird und demnach bei unvollständiger Verdauung nicht Multimere einer 220 - 230 bp Einheit ergeben kann. Mögli-

cherweise stammt die 220 - 230 bp Serie von dem BR-Gen, das in der MboII/HinfI-Doppelverdauung entdeckt wurde (siehe Abb. 27l).

Im Bereich höherer Molekulargewichte werden beide Serien nicht mehr voneinander getrennt. In jeder Serie sind bis zu 15 Einzelfragmente erkennbar. D.h. in beiden Genen bildet die repetitive Einheit Multimere von mindestens 15 Elementen. Wahrscheinlich besteht ein beträchtlicher Teil der BR-Gene aus solchen "tandem repeats".

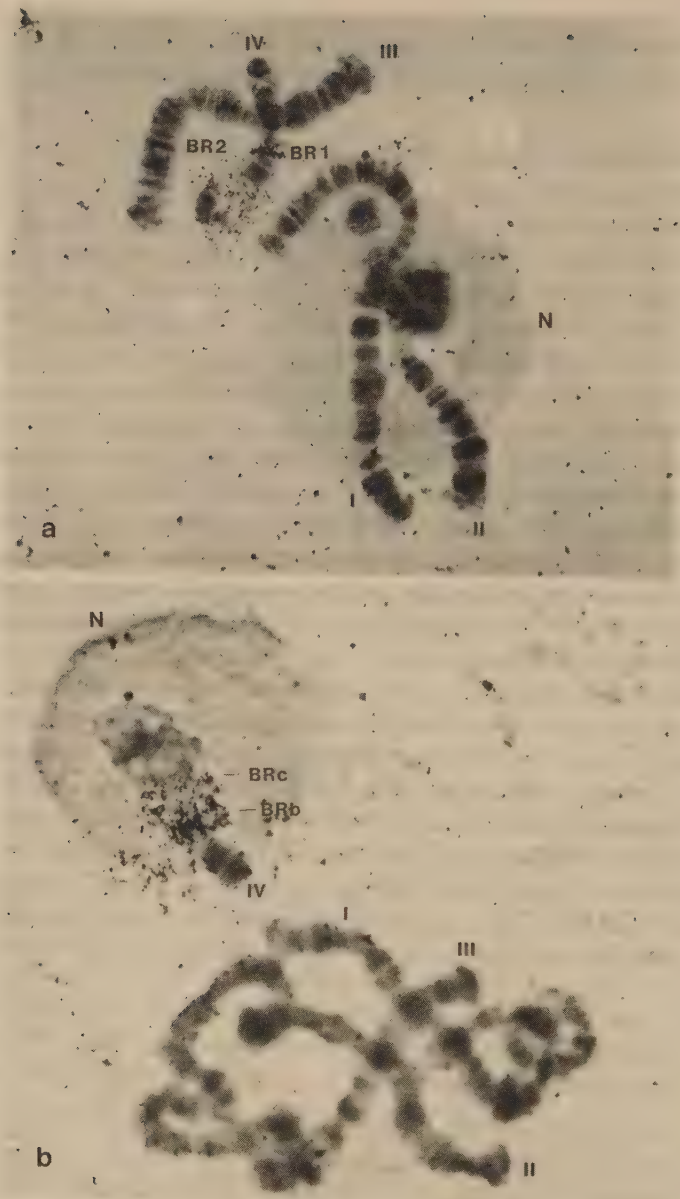
Die limitierten Verdauungen mit HinfI (Abb. 29b) zeigen Abstufungen von etwa 17 Einzelfragmenten. Unterschiede in der Hybridisierungsstärke treten hier jedoch nicht in solcher Deutlichkeit und Regelmäßigkeit auf wie im Fall der MboII-Verdauungen. Die Zugehörigkeit bestimmter Fragmente zum einen oder dem anderen Gen ist daher nicht sofort abzuleiten. Aus den Restriktionsanalysen ging hervor, daß HinfI das BR2-Gen in identische Fragmente von 240 bp zerlegt. Die 240 bp Repetitionseinheit von BR1 wird von HinfI 2 mal, wahrscheinlich sogar 3 mal geschnitten. In einer partiellen Verdauung des BR1-Gens ist also ein komplexes Profil mit wesentlich mehr Fragmenten zu erwarten als bei MboII, das nur 1 mal pro Einheit schneidet. Wahrscheinlich würde die partielle HinfI-Verdauung überhaupt keine diskreten Fragmente mehr erkennen lassen. Dies ist die Ursache dafür, daß die von BR1 stammenden Fragmente nicht durch stärkere Hybridisierung hervortreten. In Analogie zu den MboII-Verdauungen lassen sich in den HinfI-Verdauungen ebenfalls 2 Fragmentserien unterscheiden, die aus Multimeren von 240 bp bzw. 220 - 230 bp bestehen. Die 240 bp Serie enthält die Repetitionseinheiten von BR2 und die intakten Einheiten von BR1. Letztere kommen dadurch zustande, daß das Restriktionsenzym in benachbarten Monomeren von BR1 zufällig am gleichen Ort schneidet.

Die 220 - 230 bp Serie kann sich aus den oben erwähnten Gründen nicht vom BR1-Gen herleiten. Vermutlich stammt diese Serie vom gleichen BR-Gen wie die 220 - 230 bp Serie in der partiellen MboII-Verdauung. Dieses BR-Gen zeigt recht

gute Homologien zu pCtBR1-1 und wird wahrscheinlich von MboII und HinfI nur 1 mal pro Untereinheit geschnitten.

Interspezifische Konservierung von BR-Sequenzen

Die klonierte BR1-Sequenz von C. tentans zeigt nicht nur Homologie mit verschiedenen Balbianiringen dieser Spezies, sondern ist auch in den Balbianiringen anderer Chironomus-Arten konserviert. pCtBR1-1 hybridisiert in situ an den BR1 und den BR2 der nahe verwandten Art C. pallidivittatus (Abb. 30a). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die Sequenzhomologie korrespondierender Balbianiringe in den beiden Schwesterarten bereits demonstriert wurde. BR2-RNA von C. tentans hybridisiert in situ mit dem BR2 von C. pallidivittatus (Lambert und Beermann, 1975). BR1-homologe Sequenzen enthält offenbar auch die entfernter verwandte Spezies C. thummi und zwar in beiden auf dem Chromosom IV gelegenen Balbianiringen, die als BRc und BRb bezeichnet werden (Keyl, 1957). pCtBR1-1 hybridisiert mit BRb etwas stärker als mit BRc (Abb. 30b). Auch die für C. tentans spezifischen Restriktionsorte scheinen in C. thummi konserviert zu sein, denn die Hybridisierungsprofile von MboI-, MboII-, HinfI- und PvuII-verdauter C.thummi-DNA sind identisch mit denen von C. tentans (Abb. 31a). Mit der Southern Technik wurde auch die Verwandtschaft von pCtBR1-1 mit BR-Sequenzen aus C. melanotus nachgewiesen. MboI-verdaute Genom-DNA von C. melanotus ergibt BR-Fragmente von rund 40 kb und 260 bp (Abb. 31b). Wahrscheinlich erstreckt sich die Homologie bestimmter BR-Sequenzen auf alle Chironomus-Arten.


IV
III
BR2
BR1
N
I
II
a
N
BRc
BRb
IV
I
III
II
b

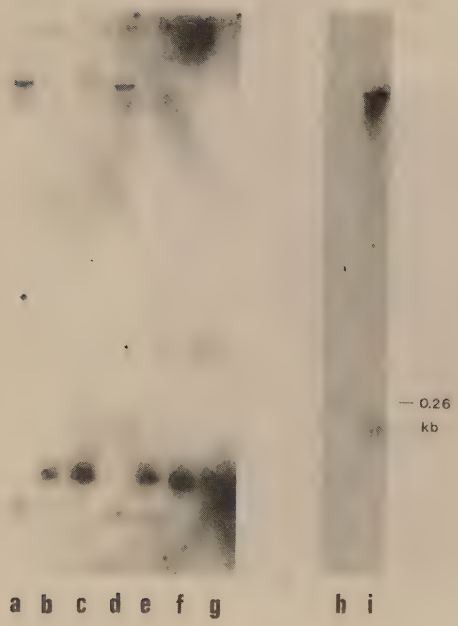


Abb. 31:

Hybridisierung BR-spezifischer Restriktionsfragmente in den Genom-DNAs von C. thummi und C. melanotus mit pCtBR1-1 und Vergleich der Restriktionsprofile mit denen von C. tentans-DNA.
a)-c) und i) C. tentans;
d)-g) C. thummi;
h) C. melanotus;
a),d),h),i) MboI;
b),e) HinfI;
f) MboII;
c),g) PvuII.

Abb. 30: In situ Hybridisierung von pCtBR1-1 ^{3}H-DNA auf Speicheldrüsenchromosomen von C. pallidivittatus und C. thummi. Die Hybridisierung erfolgte in 50 % Formamid - 0,75 M NaCl - 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) - 10 mM $MgCl_2$ - 10 % Dextransulfat (Wahl et al., 1979) mit 300 µg/ml gescherter Kalbsthymus-DNA für 14 Stunden bei 37°C mit 16^5 cpm pro Präparat. Die Chromosomen sind mit römischen Ziffern gekennzeichnet. N = Nukleolus.
a) C. pallidivittatus. BR1 und BR2 sind markiert. Vergrößerung 500fach; b) C. thummi. BRb und BRc sind markiert. Vergrößerung 700fach.

Klonierung eines Genfragmentes von BR2

Bei dem Versuch, aus MboI-verdauter Genom-DNA das 150 bp BR1-Fragment durch Klonierung in pBR322 zu isolieren, wurde mit ^{125}J-Poly(A)$^+$-RNA ein Klon selektiert, der in situ spezifisch an BR2 hybridisiert (Abb. 32). Die Länge der inte-

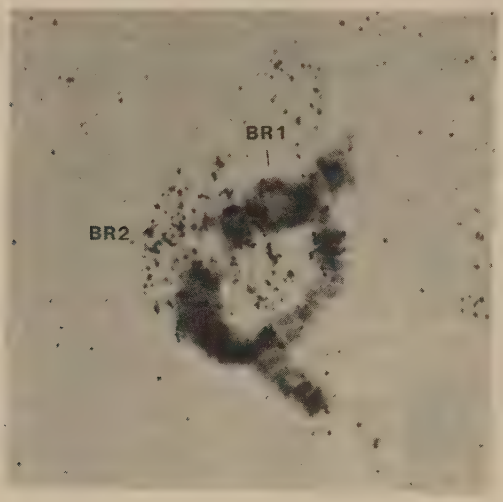


Abb. 32: In situ Hybridisierung von pCtBR2-1 ^{3}H-cRNA auf Speicheldrüsenchromosomen von C. tentans. Hybridisiert wurde in 50 % Formamid - 5 x SSC - 10 mM PIPES (pH 6,8) für 16 Stunden bei 37°C mit 10^5 cpm pro Präparat. Es ist nur das Chromosom IV (heterozygot für die lange Inversion; siehe Abb. 14a) gezeigt. Der BR2 ist markiert. Vergrößerung 700fach.

grierten C. tentans DNA beträgt etwa 130 bp. Die Hybridisierung dieses BR2-Plasmids (pCtBR2-1) auf MboI-verdaute Genom-DNA führte zu einem unerwarteten Ergebnis (Abb. 33a). Das Plasmid zeigt praktisch keine Homologie zur Bande MboI-1, die einen beträchtlichen Anteil an BR2-Sequenzen enthält. Es hybridisiert lediglich mit einem Genomfragment von 130 bp

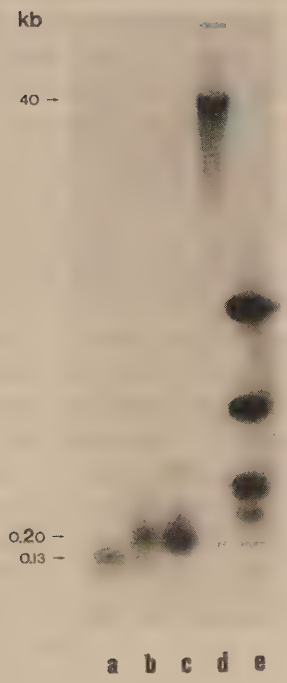


Abb. 33:

Hybridisierung von Restriktionsfragmenten in der Genom-DNA von C. tentans mit pCtBR2-1 ^{32}P-DNA.
a) MboI; b) MboII; c) HinfI; d) PvuII; e) MboI-Fragmente von pBR322.

Länge, also auf sich selbst. Kreuzreaktion mit BR1-Sequenzen tritt nicht auf. Die Hybridisierung des BR2-Klons mit BR-RNA, die In situ Markierung des BR2 und die fehlende Homologie zu den BR2-Sequenzen in MboI-1 kann nur so gedeutet werden, daß der Klon aus einem anderen Genbereich in BR2 stammt, welches mit dem BR2-Gen in MboI-1 fast keine Sequenzhomologien zeigt.

Die Hybridisierungsanalysen mit dem Klon pCtBR2-1 beweisen somit die Existenz von 2 verschiedenen Genen im BR2. Das eine dieser beiden Gene zeigt Sequenzhomologien zu BR1 und wird von der Restriktionsendonuclease MboI nicht geschnitten, während das zu pCtBR2-1 gehörige Gen keine Sequenzen

mit BR1 gemeinsam hat und von MboI in sehr kleine Fragmente zerlegt wird. Trotz fehlender Sequenzhomologien scheinen beide BR2-Gene in bezug auf Größe und repetitive Struktur ähnlich organisiert zu sein. Das zu pCtBR2-1 komplementäre Gen wird von PvuII nicht geschnitten und liegt wie das zu pCtBR1-1 kreuzhomologe Gen in Restriktionsfragmenten von etwa 50 kb Länge vor (Abb. 33d), während es von MboII und HinfI in einheitliche Fragmente von etwa 200 bp gespalten wird (Abb. 33 b,c). Die beiden letztgenannten Enzyme zerlegen also beide BR2-Gene in ihre repetitiven Einheiten. Vermutlich sind die Erkennungssequenzen dieser Enzyme konserviert.

IV. D I S K U S S I O N

Die Struktur der ribosomalen Gene von Chironomus tentans

In C. tentans ergaben Southern-Hybridisierungen von Genom-DNA mit ribosomaler RNA eine fast völlige Homogenität der ribosomalen Cistren. Spaltung der DNA mit HindIII führt zu einem prominenten Fragment von etwa 8 kb und 8 sehr schwach hybridisierenden Fragmenten in nicht äquimolaren Mengen. 4 dieser schwach markierten Fragmente könnten als "Fusionsfragmente" interpretiert werden, d.h. Sequenzen aus den Übergangsregionen zwischen Nukleolen und nicht ribosomaler DNA. Daß derartige "single copy"-Sequenzen noch nachweisbar sind, wurde mit dem Genzahl-Experiment gezeigt. Die restlichen schwachen Banden sind wahrscheinlich auf Heterogenität von einigen wenigen Cistren zurückzuführen. Worin diese Heterogenität besteht, ist auf Grund der Southern-Hybridisierungen allein nicht zu entscheiden.

Die Klonierung des prominenten, ribosomalen HindIII-Fragmentes führte zu 6 rekombinanten Plasmiden, deren integriertes C. tentans-Segment die gleiche Größe von 8,4 kb hat und die sich nur durch die Orientierung dieses Segmentes innerhalb des Vektors unterscheiden. Die Plasmide zeigen dieselben Restriktionsorte für EcoRI und PstI, so daß eine Identität auch in bezug auf die Basensequenzen anzunehmen ist. Spezifische Hybridisierung an die beiden Nukleolen der Riesenchromosomen klassifiziert die klonierten Sequenzen eindeutig als ribosomale DNA. Mit der R-Loop Kartierung von pCt318 wurden auf dem klonierten Fragment die Gene für 18S-rRNA, 28S-rRNA und 2 unterschiedlich große Spacer lokalisiert. Die zur Klonierung verwendete HindIII-Schnittstelle der rDNA liegt terminal im Gen für die 28S-rRNA. Aller Wahrscheinlichkeit nach repräsentiert daher das klonierte HindIII-Fragment ein vollständiges ribosomales Cistron.

D. melanogaster hat im 18S-Gen 2 HindIII-Schnitte, die nur

250 bp voneinander getrennt sind (Glover und Hogness, 1977). Diese Möglichkeit ist auch für C. tentans nicht völlig auszuschließen, da ein dermaßen kleines Fragment bei den anfänglichen Southern-Analysen bereits aus dem Gel gewandert sein könnte und deshalb nicht mehr entdeckt worden wäre. Allerdings liegen die HindIII-Schnittstellen bei C. tentans und D. melanogaster nicht in genau derselben Region des 18S-Gens, sondern bei C. tentans etwas mehr terminal. Was generell die Konservierung von Restriktionsorten angeht, bestehen die Ähnlichkeiten zwischen C. tentans und D. melanogaster in dem PstI-Schnitt im kleineren Spacer (Sp1) und dem Fehlen einer Erkennungssequenz für BamHI. Völlig verschieden sind die Restriktionsorte für EcoRI. Dieses Enzym schneidet das ribosomale Cistron bei Drosophila einmal am 3'-Ende des 18S-Gens, bei C. tentans dagegen zweimal im größeren Spacer (Sp2).

Die Messung der R-Loops (mit SV40-DNA als internem Standard) ergab für das ribosomale Cistron von C. tentans eine Länge von 7,84 kb. Wie von Pellegrini et al. (1977) diskutiert, können RNA:DNA-Hybride in R-Loops gegenüber der Gen32-Methode aus unbekannten Gründen bis zu 20 % verkürzt erscheinen. Die mit der Gen32-Technik präparierten RNA:DNA-Hybride waren jedoch statistisch nicht auswertbar. Die Cistronlänge von 7,84 kb ist daher höchstwahrscheinlich zu klein.

Die Restriktionskartierung mit Größenstandards in Agarosegelen ergab für das rDNA-Cistron eine Länge von 8,4 ± 0,5 kb. Dieselbe Größe bestimmten Renkawitz et al. (1979) für die ribosomale Repetitionseinheit von Sciara coprophila und bezeichneten diesen Wert als die kleinste Cistronlänge, die bisher in einem vielzelligen Eukaryonten gefunden wurde. Kürzere Einheiten sind bekannt bei einzelligen Eukaryonten: 5,6 kb bei Acetabularia (Trendelenburg et al., 1974) und 6,7 kb bei Oxytricha (Rae und Spear, 1978). Auch die gemessenen Spacerlängen von S. coprophila (0,78 kb und 1,8 kb) stimmen recht gut mit denen von C. tentans (0,75 kb und 1,77 kb) überein. In S. coprophila wird der kleinere Spacer

transkribiert. Ob dies auch bei C. tentans zutrifft, wurde nicht eindeutig festgelegt, ist aber sehr wahrscheinlich. In allen bisher analysierten, ribosomalen Cistren ist es der kürzere der beiden Spacer, der im Primärtranskirpt erscheint.

Auch die Daten über das Processing des ribosomalen 38S-Vorläufers bei C. tentans (Rubinstein und Clever, 1971) und C. thummi (Serfling et al., 1974) deuten eher auf Sp1 als den transkribierten Spacer hin. Der transkribierte Spacer kann identifiziert werden durch Hybridisierung mit dem ribosomalen 38S-Precursor oder mit der 5,8S-RNA. Das Gen für die 5,8S-RNA, die im Ribosom über Wasserstoffbrücken mit der 28S-rRNA assoziiert ist (Pene et al., 1968), liegt in allen höheren Eukaryonten im transkribierten Spacer zwischen den Genen für 18S- und 28S-rRNA.

Eine Besonderheit der ribosomalen RNA bei Insekten ist der sogenannte "hidden break" in der 28S-rRNA. Sie besteht aus 2 Molekülen von 18S, die durch Wasserstoffbrücken aneinander gebunden und mit Hitze oder denaturierenden Agentien dissoziierbar sind (Applebaum et al., 1966; Hastings und Kirby, 1966; Rubinstein und Clever, 1971; Ishikawa und Newburgh, 1972; Shine und Dalgarno, 1973; Serfling, 1976). Der "hidden break" der RNA ist korreliert mit der sogenannten "Gap"-Region der DNA, die das 28S-Gen in 2 Bereiche (28Sα und 28Sβ) gliedert. Die Gap-Region umfaßt etwa 100 Basenpaare, die beim Processing intern aus dem Vorläufer der 28S-RNA entfernt werden. Bei Spreitung von DNA:RNA-Hybriden ist die Gap-Region im Elektronenmikroskop als kurzer, einzelsträngiger Bereich zu erkennen (Wellauer und Dawid, 1977; Pellegrini et al., 1977). Auch bei C. tentans wurde gelegentlich der einzelsträngige Gap beobachtet (H.D. Royer, persönliche Mitteilung).

Es ist wahrscheinlich, daß unter den 6 rDNA-Klonen Repräsentanten beider Nukleolen vorhanden sind. Heteroduplex-Analysen der klonierten rDNA-Cistren in allen möglichen Kombinationen führten stets zu völlig doppelsträngigen DNA-

Molekülen. Zusammen mit den Restriktionsanalysen der Klone und der Genom-DNA bedeutet dies die weitgehende Homologie der im Genom vorhandenen rDNA-Cistren. Eine ähnliche Homogenität der rDNA liegt auch bei S. coprophila (Renkawitz et al., 1979) und Bombyx mori (Manning et al., 1978) vor.

Die Southern-Analyse anderer Chironomus-Arten ergab für die kanadische Population C. tentans Hedy und die nahe verwandte Spezies C. pallidivittatus ebenfalls eine homogene Struktur der rDNA. Mit EcoRI treten keine Unterschiede zu C. tentans auf; HindIII enthüllt einen zweiten Schnitt pro rDNA-Cistron in C. pallidivittatus, der wahrscheinlich im 28S-Gen liegt. Wegen des identischen EcoRI-Profils kann es sich hier nur um einen Basenaustausch gegenüber der homologen Stelle bei C. tentans handeln, der in C. pallidivittatus zur Entstehung einer zweiten Erkennungssequenz in der Mehrheit der Cistren führte.

Da die beiden kleineren HindIII-Fragmente zusammen die Länge des größten ergeben und letzteres dieselbe Größe hat wie das C. tentans-Cistron, liegt bei C. pallidivittatus keine Längenheterogenität vor. Auf eine Längenheterogenität grossen Ausmaßes deuten dagegen die HindIII und EcoRI-Profile von C. thummi und C. melanotus hin. Es gibt so viele unterschiedlich lange Moleküle mit rDNA-Sequenzen, daß sie bei der Hybridisation als kontinuierlicher Schmier erscheinen. Banden innerhalb des Schmiers lassen Uniformität zumindest eines Teils der Cistren vermuten. Die beiden kleinen, diskreten Fragmente im HindIII-Profil von C. thummi und C. melanotus liegen in äquimolaren Mengen vor und bedeuten daher mindestens 2 HindIII-Schnitte pro Cistron, wahrscheinlich in einer codierenden Sequenz. Die EcoRI-Verdauungen sind vereinbar mit mindestens 1 Schnitt pro Cistron, wobei in C. thummi überhaupt keine diskreten Fragmente mehr zu sehen sind. Ob diese ausgedehnte Heterogenität auf unterschiedlichen Längen des untranskribierten Spacers beruht wie in Xenopus (Wellauer et al., 1976) oder auf längen- und sequenzvariablen Introns im 28S-Gen wie bei Drosophila (Wellauer und Dawid, 1977), ist mit den gegenwärtigen Daten al-

lein nicht zu entscheiden. Die Voraussetzung dazu ist Klonierung und detaillierte Strukturanalyse mehrerer Cistren.

Ein hoher Anteil an unterbrochenen 28S-Genen wurde außer bei D. melanogaster auch bei anderen Drosophila-Arten gefunden, so bei D. virilis (Barnett und Rae, 1979) und D. hydei (Kunz und Glätzer, 1979), sowie bei 2 weiteren, höheren Dipteren, Calliphora erythrocephala (Beckingham und White, 1980) und Sarcophaga bullata (Barnett und Rae, 1979). Fast völlig homogen sind dagegen die ribosomalen Gene beim Seidenspinner Bombyx mori (Manning et al., 1978) und bei der Mücke Sciara coprophila (Renkawitz et al., 1979). Da die Mücken (Nematoceren) zu den niederen Dipteren zählen, sehen Barnett und Rae eine Korrelation zwischen dem Besitz von Introns und der Organisationshöhe von Dipteren. Die Homogenität der rDNA bei Camptochironomus würde in diese Vorstellung passen, nicht jedoch der kürzliche Nachweis eines signifikanten Anteils unterbrochener 28S-Gene bei der Mücke Rhynchosciara americana (A. Zaha, persönliche Mitteilung). Interessant wären in diesem Zusammenhang vielleicht die Tipuliden, die innerhalb der Nematoceren die primitivste Familie repräsentieren, also sehr alte Dipterenformen darstellen.

Außer in Dipteren wurden intervenierende Sequenzen nachgewiesen im Gen für die 25S-rRNA im Makronucleus von Tetrahymena pigmentosa (Wild und Gall, 1979), in der rDNA von Mitochondrien (Bos et al., 1978) und Chloroplasten (Rochaix und Malnoe, 1978), nicht jedoch in Vertebraten.

Die Funktion der Introns liegt im Dunkel. Für D. melanogaster (Long und Dawid, 1979) und D. hydei (Glätzer, 1979) existieren inzwischen eindeutige Hinweise darauf, daß die Intron-enthaltenden Cistren (in D. melanogaster etwa 2/3 der Gesamt-rDNA) so gut wie überhaupt nicht exprimiert werden. Andererseits muß in den Fällen, wo die unterbrochene rDNA die einzige überhaupt verfügbare ist, wie in Organellen und bestimmten Stämmen von Tetrahymena, auch eine Transkription derselben erfolgen. Die Primärtranskripte wurden vor kurzem identifiziert (Grabowski et al., 1981).

Die Entdeckung, daß in Drosophila nur die kontinuierlichen rDNA-Cistren exprimiert werden, könnte für das Vorkommen von Introns bei Dipteren allgemein von Bedeutung sein. Die nur etwa 45 Cistren im haploiden Genom von C. tentans und S. coprophila sind zum größten Teil homogen, werden also alle transkribiert. Von rund 240 Cistren in D. melanogaster (Tartof, 1979) kommen nur etwa 70 - 80 zur Expression. Diese Kopienzahl steht derjenigen von C. tentans und S. coprophila wesentlich näher als die Gesamtmenge an rDNA in Drosophila. Es sieht so aus, als seien rund 50 - 80 Kopien das Minimum, das an aktiven ribosomalen Cistren benötigt wird, je nach Entwicklungshöhe der verschiedenen Dipteren. Möglicherweise ist der Besitz von Introns bei Dipteren gekoppelt mit der Differenz zwischen total vorhandenen und tatsächlich gebrauchten rRNA-Cistren. Diese Vermutung müßte natürlich überprüft werden durch Bestimmung von Anzahl der ribosomalen Gene und Ausmaß an Heterogenität in weiteren Dipteren, z.B. in den heterogene rDNA enthaltenden Chironomiden C. thummi und C. melanotus. Ähnliche Überlegungen wurden auch von Tartof (1979) erwähnt.

In D. melanogaster und D. virilis kommen ribosomale Intronsequenzen auch außerhalb der rDNA im Genom vor (Dawid und Botchan, 1977; Barnett und Rae, 1979) und hybridisieren in situ hauptsächlich an das heterochromatische Chromozentrum (Peacock und Finnegan, zitiert in White und Hogness, 1977; P. Rae, persönliche Mitteilung). Bei den analysierten Chironomus-Spezies besteht in diesem Zusammenhang eine interessante Korrelation zwischen Heterogenität der rDNA und dem Besitz von Heterochromatin. Bei C. tentans, C. tentans Hedy und C. pallidivittatus findet sich kein cytologisch nachweisbares Heterochromatin in den Bereichen der Nukleolen (Beermann, 1955) und hier ist die rDNA homogen. C. thummi zeigt heterochromatische Blöcke an den Centromeren und im Euchromatin (Keyl und Strenzke, 1956) und C. melanotus enthält in den Centromer-Regionen aller Chromosomen aufgeblähte, zum Teil vakuolisierte, heterochromatische Elemente (Keyl, 1961). Bei C. melanotus liegt der Nukleolus auf dem

Chromosom IV in unmittelbarer Nachbarschaft der heterochromatischen Centromer-Region, ähnlich wie bei Drosophila. In diesen Heterochromatin-enthaltenden Spezies erwies sich die rDNA als heterogen. Man könnte hier einen ursächlichen Zusammenhang vermuten. Möglich wäre zum Beispiel die Entstehung der Heterogenität durch Insertion benachbarter, heterochromatischer Sequenzen in die rDNA. Als einziges Kriterium für das Vorkommen von Introns kann der Besitz von Heterochromatin aber nicht angesehen werden. Dagegen spricht die Situation bei S. coprophila, wo die ribosomalen Gene mitten im Heterochromatin liegen (Crouse et al., 1977), aber trotzdem homogen sind. In Zusammenhang mit den obigen Überlegungen über die Mindestanzahl aktiver ribosomaler Gene müßte man hier allerdings Mechanismen fordern, die gerade dieses Eindringen von Heterochromatin verhindern. Vielleicht entscheiden also zwei Faktoren über das Auftreten von Introns in der rDNA, Nachbarschaft zum Heterochromatin und Gesamtzahl der ribosomalen Cistren.

Die Struktur der Balbianiring-Gene von Chironomus tentans

Die Ergebnisse der Restriktions-Hybridisationsanalysen nach Southern bestätigen die schon länger bekannten Daten über die Gene in BR1 und BR2, nämlich ihre außerordentliche Grösse und ihre repetitive Substruktur. Die Restriktionsfragmente sind entweder sehr groß (40 - 50 kb) oder sehr klein (240 bp). Zwischengrößen in äquimolaren Mengen kommen nicht vor. Dies demonstriert anschaulich die repetitive Struktur der BR-Gene, denn diese werden entweder überhaupt nicht geschnitten und ergeben dann die 40 - 50 kb Fragmente, oder nahezu vollständig in sehr kleine Fragmente zerlegt, wenn das betreffende Restriktionsenzym innerhalb der kurzen repetitiven Einheit schneidet. Es ist anzunehmen, daß der größte Teil der BR-Gene in Form von hintereinandergeschalteten, identischen Einheiten vorliegt, ein für Strukturgene

sehr simpler Aufbau. Bis zu 17 solcher "tandem repeats" sind durch partielle Verdauung mit MboII und HinfI nachweisbar.

Eine Größe von rund 240 bp für das repetitive Grundelement kann für BR1 als fast sicher gelten. Dafür spricht der vollständige Abbau des BR1-Gens zu einem 240 bp Fragment durch 2 verschiedene Restriktionsendonucleasen, MboII und PvuII.

Die Ergebnisse mit AluI unterstützen eine "repeat"-Länge von 240 bp für BR1. Auf Grund der bekannten Nucleotidsequenz des klonierten BR1-Fragmentes würde man AluI-Fragmente von 60 bp und 180 bp erwarten. Ein 180 bp Fragment findet sich tatsächlich in der AluI-Verdauung. Das 60 bp Fragment ist zu klein als daß es mit der Southern Technik noch nachgewiesen werden könnte.

Diese Restriktionsanalysen beweisen außerdem, daß das klonierte BR1-Fragment von 147 bp ein Teil der repetitiven Einheit des BR1-Gens ist. In der Nucleotidsequenz des Klons fanden sich Erkennungssequenzen für 4 verschiedene Restriktionsenzyme; bei Anwendung dieser Enzyme auf Geno-DNA werden die langen BR-Gene in ihre Untereinheiten aufgespalten.

Eine mRNA von 37 kb könnte die 240 bp Einheit theoretisch 150 mal enthalten. Wahrscheinlich liegt die Repetitionsfrequenz aber doch etwas niedriger, da eine mRNA normalerweise untranslatierte Sequenzen am 5'- und 3'-Ende enthält. Die repetitiven Einheiten innerhalb des Gens scheinen in bezug auf Nucleotidsequenz und Länge weitgehend konserviert zu sein. Dies geht klar aus den Restriktionsanalysen hervor, denn das Gen wird von MboI, MboII, PvuII, HinfI und AluI in nur 1 bis 3 Fragmente abgebaut, je nach Anzahl der Spaltstellen in der Untereinheit. Mehr Fragmente als Erkennungssequenzen pro Einheit würde auf Längenheterogenität der einzelnen Elemente eines Gens hinweisen. Ein geringes Ausmaß an Heterogenität ist zwar für die BR-Gene nicht völlig auszuschließen (siehe unten), aber auf keinen Fall ist sie so stark ausgeprägt wie z.B. beim Fibroin-Gen (Manning und Gage, 1980). Im Fibroin-Gen liegen die mäßig repetitiven,

sogenannten "amorphen" Regionen eingestreut zwischen den hochrepetitiven "kristallinen" Domänen. Deren Länge ist innerhalb eines Gens nicht konstant, so daß die Spaltung dieses Gens in der konservierten, amorphen Region zu mehreren Fragmenten unterschiedlicher Größe und Hybridisationsstärke führt. Dieses Fragmentmuster differiert in verschiedenen Bombyx mori Stämmen. Im Fibroin-Gen liegt also ein ausgeprägter Längenpolymorphismus vor, zurückzuführen auf unterschiedliche Anzahl der repetitiven Einheiten zwischen den amorphen Domänen. Untersuchungen der C. tentans Speichelproteine aus einzelnen Tieren lassen bei BR1, BR2 und BR6 das Vorkommen von Allelen verschiedener Größe vermuten (P. Hardy, persönliche Mitteilung; Hardy und Pelling, 1980a; Edström et al., 1980). Als Entstehungsmechanismus von Allelen käme das sogenannte "unequal crossing over" in Frage, das auch als Ursache des Längenpolymorphismus der Seidenfibroine vorgeschlagen wurde (Manning und Gage, 1980). Der Beweis der Allelie bei Balbianiring-Genen steht allerdings noch aus, da bislang keine Kreuzungsanalysen mit reinen Linien durchgeführt wurden. Multiple Formen von Speichelproteinen könnten auch als Folge mehrerer exprimierter Gene pro Balbianiring auftreten. 2 aktive Genorte sind cytologisch nachgewiesen für BR1 (Beermann, 1952; siehe unten), und aus den in dieser Arbeit durchgeführten Hybridisierungsanalysen ergaben sich starke Hinweise für 2 verschiedene, exprimierte Gene in BR2 (siehe unten).

Ein völlig unerwartetes Ergebnis war das Ausmaß der Kreuzhybridisierung von pCtBR1-1 mit anderen Balbianiringen, nämlich BR2 und BR6 unter mittelstrengen Hybridisierungsbedingungen. In situ Hybridisierung bei 42°C statt 37°C verhindert zwar die Markierung des BR6, nicht jedoch die des BR2 (Abb. 34). Diese Tatsache erschwerte zunächst die Interpretation der Southern-Analysen mit pCtBR1-1.

Sequenzhomologien zwischen BR1 und BR2 wurden in der Literatur bisher nie berichtet. Ihre Abwesenheit wurde geradezu betont (Lambert, 1972; Wieslander, 1979). Es gibt wahrscheinlich mehrere Gründe dafür, warum die verwandten Se-

Abb. 34: In situ Hybridisierung der Speicheldrüsenchromosomen von C. tentans mit pCtBR1-1 ^{3}H-DNA. Die Hybridisierung erfolgte in 50 % Formamid - 0,75 M NaCl - 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) - 10 mM $MgCl_2$ - 10 % Dextransulfat (Wahl et al., 1979) und 300 µg/ml gescherter Kalbsthymus-DNA für 14 Stunden bei 42°C mit 5 x 10^4 cpm pro Präparat. Das Präparat wurde 5 Monate exponiert. In der BR6-Region des Chromosoms III (mit einem Pfeil gekennzeichnet) ist keine Markierung erkennbar. Vergrößerung 700fach.

quenzen in den beiden großen Balbianiringen nicht entdeckt wurden: (1) das Fehlen einer eindeutig monospezifischen Hybridisierungsprobe bei Verwendung von "BR1"- bzw. "BR2"-RNA, (2) geringe spezifische Aktivität der RNA aus in vivo radioaktiv markierten Speicheldrüsen und (3) zu kurze (3 - 4 Stunden) Hybridisierungsdauer der markierten RNA bei In situ Hy-

bridisierung. Die "75S"-RNA aus Drüsenzellen enthält sowohl BR1- als auch BR2-RNA und markiert beide Balbianiringe (Daneholt et al., 1977). Eine Methode zur Trennung von BR1- und BR2-RNA bestand darin, die beiden Balbianiringe durch Mikromanipulation aus dem Chromosom IV herauszuschneiden und daraus die RNA zu isolieren (Lambert et al., 1972; Lambert, 1972). In situ Hybridisierung der einzelnen RNA-Präparationen ergab stets auch mehr oder weniger deutliche Markierung des anderen Balbianirings, die von den Autoren auf Kontamination der chromosomalen RNA mit Kernsaft-RNA zurückgeführt wurde. Dies war wahrscheinlich auch der Fall. Bei kurzzeitiger Hybridisierung (4 Stunden), wie sie in diesen Experimenten angewendet wurde, ist auch mit pCtBR1-1 eine schwache Markierung des BR2 erst nach 3 bis 4 Monaten Exposition zu entdecken. Verlängert man die Hybridisierungsdauer auf 12 bis 16 Stunden, so ist die Markierung des BR2 bereits nach 1 Monat Exposition deutlich. Ein Grund für die signifikante Kreuzhybridisierung von pCtBR1-1 könnte auch darin liegen, daß die klonierten 147 Nucleotide des BR1-Gens zufällig gerade die Sequenzen enthalten, die zwischen BR1, BR2 und BR6 den höchsten Grad an Verwandtschaft zeigen. Die zur 240 bp Einheit noch fehlenden 93 Nucleotide könnten ihrerseits wieder intern repetitive Sequenzen enthalten, die möglicherweise für BR1 absolut spezifisch sind. Bei Hybridisierung von RNA, d.h. der vollständigen Einheit, würden sich in diesem Fall die Sequenzhomologien weniger stark manifestieren als mit pCtBR1-1. Die Unterteilung einer übergeordneten, repetitiven Einheit in kürzere, repetitive Bereiche ließe sich aus dem von Wobus et al. (1980) sequenzierten Fragment des Balbianirings BRc von C. thummi ableiten (siehe unten).

Die Existenz von homologen Nucleotidsequenzen in BR1, BR2 und BR6 läßt sich recht gut vereinbaren mit cytologischen Beobachtungen über den Grad der Expansion dieser Balbianiringe und den sich daraus ergebenden Konsequenzen für ihre Funktion (Beermann, 1973). Der normalerweise nur als größerer "Puff" erscheinende BR1 entwickelt sich umso mehr zum

echten Balbianiring, je kleiner, d.h. je geringer exprimiert der BR2 ist. Bei längerer Behandlung von Larven mit Galactose kollabiert der BR2 fast völlig; stattdessen ist der BR1 maximal ausgebildet und der BR6 beginnt sich ebenfalls als Balbianiring zu exprimieren, während er in der Normalsituation kaum aktiv ist. BR1, BR2 und BR6 stehen also offenbar unter gemeinsamer Kontrolle und ihre Produkte können sich bis zu einem gewissen Grad gegenseitig ersetzen. In diesem Zusammenhang könnten Strecken von homologen Sequenzen in den 3 Loci eine notwendige Rolle spielen.

Auf Grund der Homologieeigenschaften von pCtBR1-1 zeigen die Restriktionsanalysen von Genom-DNA mit Sicherheit 2 Gene (in BR1 und BR2), möglicherweise sogar 3 Gene (in BR6) gleichzeitig, was eine Interpretation mancher Hybridisationsprofile erschwert. Daß die positive Reaktion der Bande MboI-1 mit Poly(A)$^+$-RNA ausschließlich auf Gensequenzen des BR2 zurückzuführen ist, wurde durch In situ Hybridisierung gezeigt. Die Hybridisierung von pCtBR1-1 mit den BR2-Gensequenzen in MboI-1 bestätigt also die durch In situ Hybridisierung festgestellte Sequenzhomologie zwischen beiden Balbianiringen. Außerdem bedeutet der Nachweis von BR2-Gensequenzen in MboI-1 die Resistenz eines rund 40 kb langen Strukturgens gegen den "Kleinschneider" MboI und zeigt recht eindrucksvoll die bereits diskutierte, repetitive Struktur der BR-Gene und die weitgehende Konservierung der Nucleotidsequenzen in den einzelnen Repetitionseinheiten. Das 240 bp Fragment der MboI/HinfI-Doppelverdauung kann nur aus der Bande MboI-1 stammen und muß daher dem BR2 zugeordnet werden. Das bedeutet, daß die 40 kb langen BR2-Sequenzen in MboI-1 von HinfI restlos zu 240 bp Fragmenten abgebaut werden, genauso wie BR1 von MboII und PvuII. Möglicherweise gleichen sich diese beiden kreuzhomologen BR-Gene auch in der Größe ihrer repetitiven Untereinheit. Ein längerer "repeat" für das BR2-Gen kann aber nicht ausgeschlossen werden, da vielleicht zusätzliche Fragmente wegen ihrer Kürze der Entdeckung entgangen sind.

MboII zerlegt die repetitive Untereinheit des BR2-Gens offenbar in noch kleinere Fragmente als 240 bp, denn in der MboI/MboII-Doppelverdauung der Genom-DNA sind keine Fragmente mehr nachweisbar, die dem BR2 zugeschrieben werden könnten. Mit PvuII ergibt das BR2-Gen Fragmente in der Grössenordnung von 40 - 50 kb; wahrscheinlich schneidet dieses Enzym überhaupt nicht innerhalb des Gens, sondern in den flankierenden Sequenzen. Daß die 2 hochmolekularen BR-Fragmente in der AluI-Verdauung, 40 kb und 35 kb, ebenfalls von BR2 stammen, ist auf Grund der Verwandtschaft von pCtBR1-1 zum BR2-Gen anzunehmen, aber nicht sicher. Falls diese beiden AluI-Fragmente BR2-Sequenzen enthalten, so könnte die Existenz von 2 unterschiedlich großen Fragmenten vielleicht als Hinweis auf Heterogenität des BR2-Gens in bezug auf das Vorkommen von Restriktionsorten gewertet werden.

Die Doppelverdauung mit MboII/HinfI enthüllte die Existenz eines BR-Gens, das mit pCtBR1-1 hybridisiert, aber weder mit dem BR1-Gen identisch ist, aus dem pCtBR1-1 stammt, noch mit dem kreuzhomologen BR2-Gen und höchstwahrscheinlich auch nicht mit dem homologen BR6-Gen. Eine Zuordnung des 230 bp MboII/HinfI-Fragmentes zu einem weiteren BR-Gen müßte natürlich auch begründen, warum dieses Gen bei den anderen Restriktionskartierungen nicht auffiel. Eine plausible Erklärung wäre die fast identische Größe der repetitiven Untereinheit im BR1-Gen und in dem unbekannten BR-Gen und die Existenz jeweils nur einer Erkennungssequenz für MboII und HinfI in der Untereinheit des letzteren. In diesem Fall würden die MboII- und HinfI-Fragmente des unbekannten BR-Gens nämlich im Gel nicht abgetrennt von den MboII-Fragmenten des BR1-Gens bzw. den HinfI-Fragmenten des BR2-Gens und wären daher auch nicht entdeckt worden. Allerdings müßte dann in dem neuen BR-Gen eine unmittelbare Nachbarschaft des MboII- und HinfI-Restriktionsortes vorausgesetzt werden (wie z.B. in pCtBR1-1), denn andernfalls würden die Doppelverdauung und die Einfachverdauung nicht ein gleich großes Fragment ergeben.

Ein viertes, zu pCtBR1-1 homologes Gen mit den oben disku-

tierten Eigenschaften würde auch die 220 - 230 bp Fragmentserien bei den unvollständigen MboII- und HinfI-Verdauungen widerspruchsfrei erklären. Diese Serien sind eindeutig Multimere eines Grundelementes und bestehen aus definierten Einzelfragmenten. Sie müßten daher von einem Gen stammen, das sowohl von MboII als auch von HinfI nur 1 mla pro Untereinheit geschnitten wird. Letzteres trifft weder auf das zu pCtBR1-1 gehörige Gen noch auf das kreuzhybridisierende BR2-Gen zu. Die Entstehung von definierten Multimeren einer elementaren Länge aus einem Gen mit mehreren Schnitten pro Untereinheit könnte nur durch präferentielle Spaltung benachbarter Einheiten an gleich weit entfernten Restriktionssequenzen erklärt werden. Dies wäre eine ad hoc Annahme, für die es keine experimentelle Grundlage gibt.

Als möglicher Kandidat für dieses unbekannte BR-Gen käme ein anderes Gen in BR1 in Frage, denn die Existenz von 2 verschiedenen Genorten in BR1 ist seit langem bekannt. Aus cytologischen Beobachtungen und Translokationsexperimenten (Beermann, 1952, 1962) ging hervor, daß der BR1 aus 2 unterschiedlichen, um 3 Querscheiben voneinander getrennten, chromosomalen Bereichen entstehen kann, die auch beide zur Bildung eines selbstständigen BR1 befähigt sind. Diese beiden Bereiche wurden von Beermann als BR1a und BR1b bezeichnet. Es gibt demnach mit Sicherheit mindestens 2 Gene in BR1. Ob pCtBR1-1 aus BR1a oder BR1b stammt, ist unbekannt. Die Abkunft der klonierten Sequenz kann durch In situ Hybridisierung auf Malpighigefäß-Chromosomen, in denen die BR1-Region nicht gepufft ist, nachgewiesen werden.

Der BR1 in Speicheldrüsenchromosomen wird von pCtBR1-1 immer homogen markiert. Eine Interpretation dieses Befundes mit homologen Gensequenzen in BR1a und BR1b würde die Zuordnung des oben diskutierten BR-Gens erleichtern. Ein widersprüchliches Ergebnis erhielt jedoch Hollenberg (1976) bei In situ Hybridisierung von Poly(A)$^+$-RNA aus Speicheldrüsen. Hollenberg fand ausschließliche Hybridisierung in BR1b. Die BR1a-Region, obwohl expandiert, zeigte keine Markierung. Die einzig mögliche Deutung dieses Befundes ist die Existenz

von repetitiven Gensequenzen in BR1b, die in BR1a fehlen. Eine denkbare Erklärung wäre ein überwiegender Anteil der 3'-Enden der RNA bei Präparation von Poly(A)$^+$-RNA. In diesem Fall hätten die gegen das 3'-Ende zu gelegenen, repetitiven Sequenzen in BR1a und BR1b keine Homologien miteinander. Dann sollten aber auch die Southern-Hybridisierungen der Genom-DNA mit Poly(A)$^+$-RNA andere Fragmente zeigen als mit pCtBR1-1, was nicht zutrifft. Alternativ dazu könnten pCtBR1-1 und die BR1b-spezifische RNA-Sequenz aus völlig verschiedenen Genen stammen. BR1a und BR1b würden dann ihrerseits wieder 2 oder mehr Gene enthalten. Unter diesen Umständen wären homologe und nicht homologe, nämlich zu verschiedenen Genen gehörige Sequenzen in BR1a und BR1b vorstellbar. Da es sich bei Balbianiringen allgemein um sehr komplexe Loci handelt, wo in den Prozeß des "Puffing" mehrere Quer- und Zwischenscheiben einbezogen werden können, ist die obige Erklärung nicht völlig von der Hand zu weisen.

In Zusammenhang mit den Restriktionskartierungen seien auch die schwachen Banden erwähnt, die, nicht immer reproduzierbar, in den Restriktionsanalysen auftauchten. Mit Poly(A)$^+$-RNA wurde, abhängig von der Qualität der RNA-Präparation, gelegentlich ein ganzes Spektrum an schwach hybridisierenden Banden gefunden. Da die Poly(A)$^+$-RNA aber Sequenzen von mehreren verschiedenen Genen enthält, u.a. BR6, I17B und vielleicht auch BR3, kann über die Zugehörigkeit der schwachen Banden nichts ausgesagt werden. Einen Fortschritt brachte die Verwendung eines definierten Genfragmentes des BR1 zur Hybridisierung, obwohl sich dieses Genfragment unter Standardbedingungen als nicht streng spezifisch erwies. In den MboI-Verdauungen der Genom-DNA tauchte ein BR-Fragment von 250 bp reproduzierbar auf. Dieses Fragment wird von Poly(A)$^+$-RNA gleich stark markiert wie das 147 bp BR1-Fragment, von pCtBR1-1 dagegen schwächer als letzteres. Dies läßt in dem 250 bp MboI-Fragment ein anderes, repetitives Gen vermuten. BR6 zum Beispiel wäre ein guter Kandidat. Mit MboII, HinfI und PvuII finden sich neben dem prominenten Fragment von 240 bp schwächere Banden von 420, 430

und 450 bp und noch größere, ganz schwach markierte Fragmente. Bei MboII und HinfI gibt es außerdem eine geringe, resistente BR-Fraktion von etwa 3 kb Länge. Hier zeigt das 240 bp Fragment allerdings auch mit Poly(A)$^+$-RNA die stärkste Hybridisierung. Die schwach markierten Fragmente könnten demnach aus einem der zwei BR1-Gene stammen oder aus beiden. Möglich wären eine geringe Anzahl von veränderten, d.h. längeren Repetitionseinheiten, die dann unter die 240 bp Einheiten verstreut wären, oder aber auf demselben Prinzip beruhende, allelische Varianten des Gens bzw. der Gene. Es könnte sich auch um "Fusionsfragmente" handeln, die den hochrepetitiven Teil eines Gens mit nichtrepetitiven Sequenzen verbinden, z.B. an den Genenden oder in Introns, deren Existenz nicht ausgeschlossen werden kann. Aufklärung über den Ursprung dieser Fragmente ist nur durch ihre Klonierung zu erhoffen.

Die Klonierung von pCtBR2-1 führte zum Nachweis von 2 verschiedenen, in bezug auf ihre Nucleotidsequenz kaum miteinander verwandten Genen in BR2. Dies wurde daraus gefolgert, daß dieser Klon komplementär zu RNA und Teil einer repetitiven Sequenz ist, in situ den BR2 markiert aber mit den BR2-Gensequenzen in MboI-1 so gut wie nicht hybridisiert. Die beiden Gene unterscheiden sich auch durch ihr Verhalten gegenüber MboI. Das Gen in MboI-1 wird von MboI nicht geschnitten, das zu pCtBR2-1 gehörige Gen dagegen in Fragmente von 130 bp zerlegt, von denen eines in pCtBR2-1 kloniert wurde. Die Ähnlichkeiten zwischen beiden Genen bestehen in ihrer etwa gleichen Größe (40 kb), repetitiven Substruktur und Erkennungssequenzen für HinfI und MboII innerhalb der repetitiven Einheit. Wie im Fall des BR1 sprechen cytologische Untersuchungen ebenfalls für 2 Entstehungsorte des BR2. Beermann (1952, 1973) lokalisierte den Ursprung des BR2 anhand von Larven mit nicht oder kaum induziertem BR2 in der mittelstarken Querscheibe 3B8 des Chromosoms IV, während Derksen et al. (1980) aus In situ Hybridisierungen von BR2-RNA auf Malpighigefäß-Chromosomen und den durch Galactose reprimierten BR2 in Speicheldrüsenchromosomen die Beschrän-

kung des BR2-Locus auf die dicke Querscheibe 3B10 ableiten. 2 verschiedene Entstehungsorte des BR2 würden auch für 2 verschiedene Gene sprechen. Auf Grund von DNA-Sättigungshybridisierungen mit Poly(A)$^+$-RNA bzw. 75S-RNA wurde die Anzahl der Gene in BR2 mit 1 - 2 (Hollenberg, 1976) bzw. 1 - 4 (Wieslander, 1979) angegeben. Die Eigenschaften des Klons pCtBR2-1 bedeuten recht gute Evidenz für 2 verschiedene Gene in BR2. Beide Gene werden transkribiert, wie aus der Hybridisierung der Bande MboI-1 und der Transformantenkolonie pCtBR2-1 mit Poly(A)$^+$-RNA hervorgeht. Möglicherweise werden die beiden Gene differentiell exprimiert, denn Lamb und Daneholt (1979) beobachteten bei Miller-Spreitungen des BR2 nur eine aktive Transkriptionseinheit.

Die in pCtBR1-1 enthaltenen DNA-Sequenzen sind nicht nur in verschiedenen Balbianiringen von C. tentans konserviert, sondern auch in denen anderer Spezies. pCtBR1-1 hybridisiert mit BR1 und BR2 von C. pallidivittatus und auch mit beiden Balbianiringen (BRb und BRc) der entfernter verwandten Art C. thummi, letzteres im Gegensatz zu Berichten über das Fehlen von Homologie zwischen BR-Sequenzen aus C. tentans und C. thummi (Wobus et al., 1980). Die Restriktionsprofile von C. thummi und C. tentans-DNA mit MboI, MboII, HinfI und PvuII nach Hybridisierung mit pCtBR1-1 unterscheiden sich nicht voneinander. In MboI-verdauter C. melanotus DNA hybridisiert pCtBR1-1 deutlich mit Genomfragmenten von etwa 260 bp und schwach mit Fragmenten von 40 kb. Die interspezifische Konservierung bestimmter Nucleotidsequenzen in den Balbianiringen erscheint folgerichtig im Hinblick auf die Funktion ihrer Produkte, der Speichelproteine. Diese dienen in allen Chironomus Spezies dem gleichen Zweck, nämlich der Verklebung von totem Material beliebiger Art zu einer Schutzröhre, in der sich die Larve aufhält.

Die von Wobus et al. (1980) publizierte Nucleotidsequenz aus dem BRc von C. thummi ermöglichte es, die mit Hybridisierungen gefundene Homologie zwischen BR-Sequenzen aus C. tentans und C. thummi direkt zu untermauern. Wie das BR1-Fragment enthält die BRc-Sequenz 2 AluI-Schnittstellen

im Abstand von 60 bp und dazwischen eine MboII- und HinfI-Erkennungssequenz in gleicher Anordnung wie pCtBR1-1. Im Bereich dieser Restriktionsorte ist die Ähnlichkeit zwischen beiden Nucleotidequenzen frappierend (Abb. 35). Von 88 Basen in pCtBR1-1 und dem BRc-Klon stimmen 72 überein, d.h. in diesem Teil sind beide Klone zu 80 % homolog. Nach Wobus et al. entspricht der BRc in C. thummi dem BR1 in C. tentans. Die Sequenz enthält aber weder MboI- noch PvuII-Restriktionsorte, die auf Grund der Southern-Hybridisierungen in dem zu BR1 homologen Balbianiring von C. thummi ge-

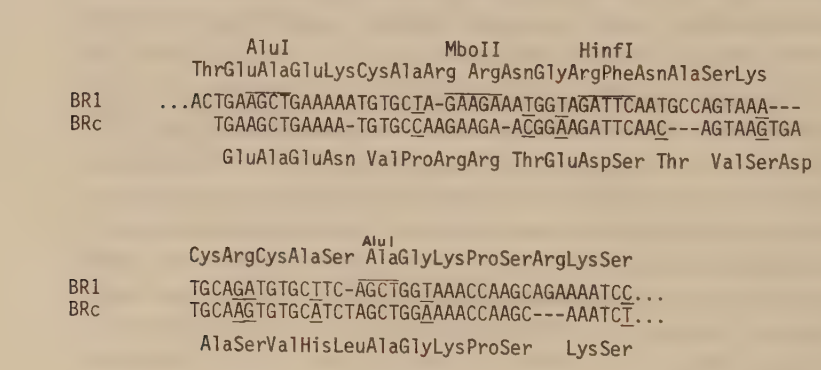


Abb. 35: Homologie zwischen proteincodierenden Nucleotidsequenzen in Balbianiringen von C. tentans und C. thummi. Die Nucleotide 45-134 aus dem BR1-Fragment sind der Anfangssequenz des von Wobus et al. (1980) sequenzierten Fragmentes aus dem BRc von C. thummi gegenübergestellt. Der hier gezeigte DNA-Strang des BRc-Fragmentes ist der entgegengesetzte zu dem, den Wobus et al. als den mRNA-ähnlichen Strang ansehen. Nicht homologisierbare Nucleotide sind entweder durch Gedankenstriche gekennzeichnet oder unterstrichen. Die zu BR1 gehörigen Aminosäuren sind über der BR1-Sequenz aufgeführt, die aus der BRc-Sequenz abgeleiteten unterhalb dieser Sequenz. Die in beiden Sequenzen vorkommenden Restriktionsorte sind durch waagrechte Linien über der BR1-Sequenz angedeutet; in der obersten Zeile stehen die zugehörigen Restriktionsenzyme.

fordert werden müßten. Durch eine Gleichsetzung BRc = BR2 würde sich dieser Widerspruch auflösen. Für eine Äquivalenz von BRc und BR2 spricht auch eine funktionelle Eigenschaft dieses Balbianirings: Nach Galactosebehandlung von C. thummi kollabiert BRc und BRb expandiert, d.h. BRc verhält sich wie BR2 und BRb wie BR1 (Santa-Cruz et al., 1978). Wenn also BRc dem BR2 entspricht, dann hätte pCtBR1-1 - in einem begrenzten Bereich - 80 % Sequenzhomologie mit einem funktionell nicht homologen Balbianiring in einer anderen Spezies. Das Ausmaß der Sequenzhomologie zwischen BR1 und BR2 könnte dann in der entsprechenden Region ebenfalls um die 80 % betragen.

Die Sequenz des BR1-Fragmentes enthält in jedem DNA-Strang einen offenen Leseraster, aber nur einer führt zu einer Aminosäurezusammensetzung, die recht gut übereinstimmt mit der von Großbach (1969) bestimmten Aminosäurezusammensetzung des Gesamtspeichels von C. tentans, vor allem, was den hohen Gehalt an Arginin und Lysin betrifft. Im anderen Raster kommt keine dieser beiden Aminosäuren vor. Auf Grund von Terminationscodonen in 5 von 6 möglichen Leserastern befürworteten Wobus et al. den einzig offenen und leiteten daraus ein Peptid ab, dessen Aminosäurekomposition aber nur geringe Ähnlichkeit mit Großbachs Daten zeigt. Die zu einem anderen Leseraster im komplementären Strang gehörigen Aminosäuren würden besser zu Großbachs Daten passen. Zwar enthält dieser Raster 1 Stop-Codon, aber erst ganz am Ende des sequenzierten Bereichs. Dieser Raster scheint dem für das BR1-Fragment wahrscheinlichen zu entsprechen, denn von 28 Aminosäuren stimmen 12 überein, darunter eine Sequenz von 3 (Glu-Ala-Glu) und eine Sequenz von 5 Aminosäuren (Ala-Gly-Lys-Pro-Ser). Das terminale UAG-Codon könnte eine Erklärung dadurch finden, daß zufällig das Ende einer codierenden Sequenz kloniert wurde. Die Autoren selbst weisen mehrmals darauf hin, daß ihre Sequenz vor allem in bezug auf die darin vorkommenden Restriktionsorte "atypisch" sei, verglichen mit dem Verhalten des intakten BRc-Gens gegenüber denselben Restriktionsenzymen.

Die BRc-Sequenz zeigt eine andere, sehr interessante Eigenschaft. Auf den zu pCtBR1-1 homologen Teil folgt nämlich eine in bezug auf Basen und Aminosäuren nahezu identische Sequenz von 58 bp 2mal hintereinander. Wobus et al. schließen daraus auf eine Evolution der nach ihren Daten für BRc charakteristischen 175 bp "repeats" aus den kleinen Einheiten von 58 bp, obwohl die 58 bp Einheiten in der Sequenz nur 2 mal sehr gut übereinstimmen und ansonsten als "degeneriert" bezeichnet werden. Tatsache ist jedoch, daß eine größere, repetitive Einheit existiert, die intern noch kurze, repetitive Sequenzen enthält. Die fehlenden 93 bp der Einheit von BR1 zum Beispiel könnten ebenfalls aus solchen kurzen "repeats" bestehen. Reassoziationskinetiken von BR1- und BR2-RNA in DNA-Excess (Wieslander, 1979) zeigen einen biphasischen Verlauf, was auf eine Hierarchie von repetitiven Sequenzen in den BR-Genen schließen läßt. Möglicherweise sind es diese kurzen "repeats", in denen sich die individuellen Balbianiringe grundlegend unterscheiden. Auf Grund ihrer geringeren Komplexität würden die kurzen "repeats" schneller hybridisieren als die restlichen Sequenzen der übergeordneten Repetitionseinheit, die den kreuzhomologen Teil beinhalten. Zusammen mit kurzzeitiger In situ Hybridisierung und geringer spezifischer Aktivität der markierten RNA würde eine derartige interne Struktur vielleicht dazu beitragen, daß die Sequenzhomologie zwischen Balbianiringen bislang nicht entdeckt wurde.

Die Klonierung von längeren Strecken solcher hierarchisch aufgebauten "repeats" ist wahrscheinlich nicht möglich. Wobus et al. berichten vom Verlust der Hälfte ihres ursprünglich 1,3 kb langen BRc-Fragmentes während der Vermehrung in E. coli. Was die BR1-Klone angeht, ist Instabilität aber nicht die Ursache für die Klonierung von 150 bp aus 40 kb Fragmenten. Dagegen spricht die Zugehörigkeit der klonierten und der zur Klonierung eingesetzten BR-Fragmente zu verschiedenen Balbianiringen, die identische Größe der 8 unabhängig isolierten BR1-Fragmente und die ausschließliche Hybridisierung eines der BR1-Klone mit den 150 bp Genomfragmenten unter sehr strengen Bedingungen.

Abgesehen von den hochrepetitiven Sequenzen ist eine Klonierung von Molekülen der Größenordnung 40 - 50 kb in einem normalen Vektorplasmid ohnehin schlecht möglich. Die Analyse von einigen, zufällig ausgewählten rekombinanten Plasmiden des obigen Klonierungsexperimentes ergab, daß sie alle sehr kleine Plasmide hatten. Vermutlich wurden in diesem Experiment hauptsächlich Kontaminanten kloniert. Die Verwendung des λ-Vektors Charon 9 zur Klonierung der langen HindIII-Fragmente konnte ebenfalls nicht zum Erfolg führen, da die maximale Insertionskapazität dieses Vektors nur 23 kb beträgt und die wirkliche Größe der BR-Fragmente sich erst später herausstellte. Die einzigen Vektoren, mit denen man DNA-Moleküle dieser Größenordnung klonieren könnte, sind die speziell für sehr große DNA-Insertionen konstruierten Cosmide (Collins und Hohn, 1978). Mit dem Cosmid-Vektor pHC79, einem Derivat von pBR322 (Hohn und Collins, 1980), wurde versucht, die Fragmente der Bande MboI-1 zu klonieren. Die Kapazität dieses Vektors sollte für 40 kb Moleküle ausreichen. Unter den Transduktanten wurden bei Koloniehybridisierung mit Poly(A)$^+$-RNA mehrere positive Klone gefunden, nach Anzucht dieser Klone und Isolierung ihrer Plasmide konnten jedoch keine BR-spezifischen Insertionen mehr nachgewiesen werden. Falls diese Klone tatsächlich BR2-Fragmente enthalten hatten, so muß die Elimination der repetitiven Sequenzen unglaublich schnell vor sich gegangen sein. Dies würde im Widerspruch zu den Ergebnissen von Oshima und Suzuki (1977) stehen, denen es immerhin gelang, das gesamte Fibroin-Gen (16 kb) zu klonieren, auch wenn sich dieser Klon später als instabil erwies. Sowohl der von diesen Autoren verwendete Vektor pMB9 als auch pHC79 sind sogenannte "multicopy" Plasmide, die eine eventuelle Instabilität klonierter Sequenzen noch steigern. Das Schicksal der BR-Sequenzen in diesen Experimenten ist also noch ziemlich unklar.

Die Plasmide aus einigen nicht BR-spezifischen, rekombinanten Cosmid-Klonen zeigten fast alle Instabilität, kenntlich an multiplen Fragmenten in nicht äquimolarem Verhältnis nach dem spezifischen Ausschneiden der Insertion mit Sau3A.

Mit dem Cosmid-System wurde ein relativ stabiler, Telomer-spezifischer Klon isoliert und 3 instabile Klone, die an viele Orte über alle Chromosomen verstreut hybridisieren, also wahrscheinlich Familien von mittelrepetitiven Sequenzen enthalten. Bei einem dieser Klone fand sich "heterozygote" Markierung in einem Bereich, wo keine Paarungsstörung zwischen beiden homologen Chromosomen zu beobachten war. Daraus folgt, daß in einem Partner eine repetitive DNA-Sequenz vorhanden ist, die dem anderen an der gleichen Stelle fehlt. Vielleicht ist dies ein Hinweis auf "mobile" Sequenzen in Chironomus, ähnlich wie copia, 412 und 297 in Drosophila (Finnegan et al., 1978; Strobel et al., 1979).

Die repetitiven Gensequenzen der Balbianiringe sind wahrscheinlich nur als kleine Stücke, z.B. 1 intakte Repetionseinheit, stabil klonierbar. Da die Einheiten jedoch weitgehend identisch zu sein scheinen, müßte dies für Restriktionskartierungen und cytologische Analysen im Prinzip ausreichen. Interessant im Hinblick auf Konservierung, Transkription und Translation wären vor allem die Sequenzen an den Genenden und darüber hinaus die Regulation der verschiedenen Balbianiring-Gene.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Als Ausgangspunkt der Untersuchungen wurden unter Anwendung der Southern "blotting" Technik mit markierter rRNA und Poly(A)$^+$-RNA aus Speicheldrüsen rDNA- und Balbianiring-spezifische Restriktionsfragmente in der Genom-DNA von Chironomus tentans nachgewiesen.

Für die ribosomalen Cistren ergaben diese Analysen eine sehr einheitliche Struktur. Nach Restriktion mit HindIII tritt in der Genom-DNA nur 1 prominentes rDNA-Fragment von 8,4 kb auf. Dieses HindIII-Fragment wurde durch Klonierung in pBR313 isoliert. Wie die R-Loop Analyse zeigte, besteht das rDNA-Fragment aus den Genen für 18S- und 28S-rRNA und 2 unterschiedlich großen Spacern, repräsentiert also sehr wahrscheinlich 1 intaktes, ribosomales Cistron. Die 6 unabhängig voneinander klonierten rRNA-Cistren sind in bezug auf Länge und Lage von Restriktionsorten identisch. Mit Heteroduplex-Analysen der 6 Klone konnten keine ungepaarten Bereiche festgestellt werden.

Der Vergleich der ribosomalen DNA aus C. tentans und C. tentans Hedy (eine kanadische Population), C. pallidivittatus (eine Schwesterart), C. thummi thummi und C. melanotus ergab eine homogene Struktur in C. tentans Hedy und C. pallidivittatus, in C. thummi thummi und C. melanotus dagegen eine extensive Heterogenität. Die molekulare Basis dieser Heterogenität ist nicht bekannt. Möglicherweise steht sie in Zusammenhang mit größeren Mengen an Heterochromatin im Bereich des Nukleolenbildungsortes, wie sie bei C. thummi und C. melanotus existieren, bei C. tentans und C. pallidivittatus dagegen nicht nachweisbar sind.

Als Folge der außerordentlichen Größe der Balbianiring-Gene und ihrer intern repetitiven Struktur konzentrieren sich BR-spezifische Sequenzen der Genom-DNA überwiegend in sehr hochmolekularen Restriktionsfragmenten von 40 - 50 kb. Mit der Restriktionsendonuclease MboI fanden sich 3 BR-Fragmente

von 40, 0,25 und 0,15 kb. Die 40 kb Fragmente sind spezifisch für BR2, wie durch In situ Hybridisierung gezeigt wurde. Das 150 bp Fragment wurde durch Klonierung in E. coli isoliert. Die 8 identischen, rekombinanten Plasmide hybridisieren in situ mit schneller Kinetik an BR1 und schwächer, aber signifikant an BR2 und BR6. Das klonierte 150 bp Fragment stammt demzufolge von BR1 und die Markierung des BR2 und BR6 wird als Kreuzhybridisierung interpretiert. In diesen 3 Balbianiringen existieren also sequenzhomologe Bereiche.

Die DNA-Sequenzierung eines der BR1-Plasmide (pCtBR1-1) ergab für das integrierte BR1-Fragment eine genaue Länge von 147 bp und darin Erkennungssequenzen für 4 Restriktionsenzyme. Bei Anwendung dieser Enzyme auf Genom-DNA verschwinden die 40 - 50 kb langen BR-Fragmente. Stattdessen finden sich BR-Sequenzen jetzt in Restriktionsfragmenten von 240 bp oder kleiner. Offensichtlich schneiden die 4 Restriktionsenzyme die repetitive Untereinheit des BR1-Gens und zerlegen das 40 kb lange Gen dadurch in 1 oder 2 sehr kurze Fragmente. Die klonierte BR1-Sequenz ist ein Teil der repetitiven Untereinheit.

Eine Größe von 240 bp für die Untereinheit des BR1-Gens wird durch mehrere Restriktionskartierungen nahegelegt. Auch im kreuzhomologen BR2-Gen ist eine Einheit ähnlicher Größe wahrscheinlich.

Die endogenen Sequenzwiederholungen in den BR-Genen lassen sich überzeugend demonstrieren durch partielle Spaltung mit Restriktionsenzymen, die pro Untereinheit 1mal schneiden. Das Resultat sind Serien von Fragmenten, die sich jeweils um die Größe einer Einheit unterscheiden. Bis zu 17 definierte Einzelfragmente konnten in einer Serie nachgewiesen werden. Folglich liegen die repetitiven Einheiten in Form von "tandem repeats" mit mindestens 17 Elementen vor. Vermutlich setzt sich der überwiegende Teil der BR-Gene aus solchen tandem repeats zusammen.

Aus MboI-verdauter Genom-DNA wurde ein weiterer, zu BR-RNA

komplementärer Klon isoliert. Die Länge der Insertion beträgt etwa 130 bp. Dieser Klon hybridisiert spezifisch an BR2. Das BR2-Fragment ist Teil eines repetitiven, etwa 40 kb großen Gens, analog den bereits erwähnten BR-Genen. Mit diesen zeigt das klonierte BR2-Fragment aber fast keine Homologie. Dies wird als Hinweis darauf gewertet, daß in BR2 2 ähnlich strukturierte, aber in ihrer Nucleotidsequenz unterschiedliche Gene existieren. Sie werden beide exprimiert.

BR-Gensequenzen sind über die Artgrenzen hinaus konserviert. pCtBR1-1 hybridisiert in situ mit BR1 und BR2 von C. pallidivittatus, mit beiden Balbianiringen (BRb und BRc) von C. thummi und mit BR-Fragmenten in der Genom-DNA von C. melanotus.

VI. L I T E R A T U R

Acton, A.B.:
A study of the differences between widely separated population of Chironomus (= Tendipes) tentans (Diptera).
Proc. Roy. Soc. Lond. B. 151, 277-296 (1959)

Applebaum, S.W., Ebstein, R.P., Wyatt, G.R.:
Dissociation of ribosomal ribonucleic acid from silkmoth pupae by heat and dimethylsulfoxide: Evidence for specific cleavage points.
J. Mol. Biol. 21, 29-41 (1966)

Aviv, H., Leder, P.:
Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose.
Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 1408-1412 (1972)

Balbiani, E.G.:
Sur la structure du noyau des cellules salivaires chez les larves de Chironomus.
Zool. Anz. 4, 637-641 (1881)

Barnett, T., Rae, P.M.M.:
A 9,6 kb intervening sequence in D. virilis rDNA, and sequence homology in rDNA interruptions of diverse species of Drosophila and other Diptera.
Cell 16, 763-775 (1979)

Bauer, H., Beermann, W.:
Die Polytänie der Riesenchromosomen.
Chromosoma 4, 630-648 (1952)

Beckingham, K., White, R.:
The ribosomal DNA of Calliphora erythrocephala; an analysis of hybrid plasmids containing ribosomal DNA.
J. Mol. Biol. 137, 349-373 (1980)

Beermann, W.:
Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von Chironomus tentans.
Chromosoma 5, 139-198 (1952)

Beermann, W.:
Cytologische Analyse eines Camptochironomus-Artbastards. I. Kreuzungsergebnisse und die Evolution des Karyotypus.
Chromosoma 7, 198-259 (1955)

Beermann, W.:
Chromosomal differentiation in insects.
In: Developmental Cytology, ed. D. Rudnick, pp. 83-103, Ronald, New York (1959)

Beermann, W.:
Ein Balbianiring als Locus einer Speicheldrüsen-Mutation.
Chromosoma 12, 1-25 (1961)

Beermann, W.:
Riesenchromosomen.
Protoplasmatologia VI D. Wien: Springer (1962)

Beermann, W.:
Directed changes in the pattern of Balbiani ring puffing in Chironomus: Effects of a sugar treatment.
Chromosoma 41, 297-326 (1973)

Bellamy, A.R., Ralph, R.K.:
Recovery and purification of nucleic acids by means of cetyltrimethylammonium bromide.
Methods in Enzymology, Vol. 12 B, 156-160 (1968)

Birnboim, H.C., Doly, J.:
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl. Ac. Res. 7, 1513-1523 (1979)

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C., Boyer, H.W.:
Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9.
Gene 2, 75-93 (1977a)

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W.:
Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.
Gene 2, 95-113 (1977b)

Bos, J.L., Heyting, C., Borst, P., Arnberg, A.C., Van Bruggen, E.F.J.:
An insert in the single gene for the large ribosomal RNA in yeast mitochondrial DNA.
Nature 275, 336-338 (1978)

Büchner-Vollmers, A., Hollenberg, C.P.:
Sutdy of salivary gland specific transcripts in Chironomus tentans by cDNA analyses.
Chromosoma (1981), im Druck

Case, S.T., Daneholt, B.:
The size of the transcription unit in Balbiani ring 2 of Chironomus tentans as derived from analysis of the primary transcript and 75S RNA.
J. Mol. Biol. 124, 223-241 (1978)

Collins, J., Hohn, B.:
Cosmids: A type of plasmid gene-cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage λ heads.
Proc. Nat. Acad. Sci. 75, 4242-4246 (1978)

Crouse, H.V., Gerbi, S.A., Liang, C.M., Magnus, L., Mercer, I.M.:
Localization of ribosomal DNA within the proximal X heterochromatin of Sciara coprophila (Diptera, Sciaridae).
Chromosoma 64, 305-318 (1977)

Daneholt, B., Hosick, H.:
Evidence for transport of 75S RNA from a discrete chromosome region via nuclear sap to cytoplasm in Chironomus tentans.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 442-446 (1973)

Daneholt, B.:
Transcription in polytene chromosomes.
Cell 4, 1-9 (1975)

Daneholt, B., Andersson, K., Fagerlind, M.:
Large-sized polysomes in Chironomus tentans salivary glands and their relation to Balbiani ring 75S RNA.
J. Cell Biol. 73, 149-160 (1977)

Dawid, I.B., Botchan, P.:
Sequences homologous to ribosomal insertions occur in the Drosophila genome outside the nucleolus organizer.
Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 4233-4237 (1977)

Degelmann, A., Royer, H.D., Hollenberg, C.P.:
The organization of the ribosomal RNA genes of Chironomus tentans and some closely related species.
Chromosoma 71, 263-281 (1979)

Denhardt, D.T.:
A membrane filter technique for the detection of complementary DNA.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 641-646 (1966)

Derksen, J., Wieslander, L., Van der Ploeg, M., Daneholt, B.:
Identification of the Balbiani ring 2 chromomere and determination of the content and compaction of its DNA.
Chromosoma 81, 65-84 (1980)

Dreiseikelmann, B., Eichenlaub, R., Wackernagel, W.:
The effect of differential methylation by Escherichia coli of plasmid DNA and phage T7 and λDNA on the cleavage by restriction endonuclease MboI from Moraxella bovis.
Biochim. Biophys. Acta 562, 418-428 (1979)

Edström, J.E., Beermann, W.:
The base composition of nucleic acids in chromosomes, puffs, nucleoli, and cytoplasm of Chironomus salivary gland cells.
J. Cell Biol. 14, 371-379 (1962)

Edström, J.E., Daneholt, B.:
Sedimentation properties of the newly synthesized RNA from isolated nuclear components of Chironomus tentans salivary gland cells.
J. Mol. Biol. 28, 331-343 (1967)

Edström, J.E., Tanguay, R.:
Cytoplasmic ribonucleic acids with messenger characteristics in salivary gland cells of Chironomus tentans.
J. Mol. Biol. 84, 569-583 (1974)

Edström, J.E., Rydlander, L., Francke, C.:
Concomitant induction of a Balbiani ring and a giant secretory protein in Chironomus salivary glands.
Chromosoma 81, 115-124 (1980)

Fiers, W., Contreras, R., Haegeman, G., Rogiers, H., Van de Voorde, A., Van Heuverswyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaert, G., Ysebaert, M.:
Complete nucleotide sequence of SV40 DNA.
Nature 273, 113-120 (1978)

Finnegan, D.J., Rubin, G.M., Young, M.W., Hogness, D.S.:
Repeated gene families in Drosophila melanogaster.
Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 42, 1053-1063 (1977)

Gage, L.P., Manning, R.F.:
Determination of the multiplicity of the silk fibroin gene and detection of fibroin gene related DNA in the genome of Bombyx mori.
J. Mol. Biol. 101, 327-348 (1976)

Gall, J.G., Pardue, M.L.:
Nucleic acid hybridization in cytological preparations.
Methods in Enzymology, Vol. 21 D, 470-480 (1971)

Gerbi, S.A., Crouse, H.V.:
Further studies on the ribosomal RNA cistrons of Sciara coprophila (Diptera).
Genetics 83, 81-90 (1976)

Glätzer, K.H.:
Length of transcribed rDNA repeating units in spermatocytes of Drosophila hydei: Only genes without an intervening sequence are expressed.
Chromosoma 75, 161-175 (1979)

Glover, D.M., Hogness, D.S.:
A novel arrangement of the 18S and 28S sequences in a repeating unit of Drosophila melanogaster rDNA.
Cell 10, 213-224 (1977)

Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Cech, T.R.:
The intervening sequence of the ribosomal RNA precursor is converted to a circular RNA in isolated nuclei of Tetrahymena.
Cell 23, 467-476 (1981)

Greenberg, J.R.:
Synthesis and properties of ribosomal RNA in Drosophila.
J. Mol. Biol. 46, 85-98 (1969)

Greene, P.J., Betlach, M.C., Goodman, H.M., Boyer, H.W.:
The EcoRI restriction endonuclease.
Methods in Molecular Biology, Vol. 7, 87-111 (1974)

Großbach, U.:
Chromosomen-Aktivität und biochemische Zelldifferenzierung in den Speicheldrüsen von Camptochironomus.
Chromosoma 28, 136-187 (1969)

Großbach, U.:
Chromosome puffs and gene expression in polytene cells.
Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 38, 619-627 (1973)

Grunstein, M., Hogness, D.S.:
Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene.
Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 3961-3965 (1975)

Hardy, P.A., Pelling, C.:
In vitro translation of Balbiani ring RNA from Chironomus tentans.
Chironomidae: Ecology, systematics, cytology and physiology, 3-8, Oxford, New York: Pergamon Press (1980a)

Hardy, P.A., Pelling, C.:
Cell-free synthesis and immunological characterization of salivary proteins from Chironomus tentans.
Chromosoma 81, 403-417 (1980b)

Hastings, J.R.B., Kirby, K.S.:
The nucleic acids of Drosophila melanogaster.
Biochem. J. 100, 532-539 (1966)

Hertner, T., Meyer, B., Eppenberger, H.M., Mähr, R.:
The secretion proteins in Chironomus tentans salivary glands: Electrophoretic characterization and molecular weight estimation.
Wilhelm Roux's Archives 189, 69-72 (1980)

Hollenberg, C.P.:
Proportionate representation of rDNA and Balbiani ring DNA in polytene chromosomes of Chironomus tentans.
Chromosoma 57, 185-197 (1976)

Hohn, B., Collins, J.:
A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments.
Gene 11, 291-298 (1980)

Hughes, M., Kafatos, F.C.:
Processing of ribosomal RNA precursor in isolated insect nuclei.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 1108-1113 (1970)

Ishikawa, H., Newburgh, R.W.:
Studies of the thermal conversion of 28S RNA of Galleria mellonella (L.) to an 18S product.
J. Mol. Biol. 64, 135-144 (1972)

Katz, L.R., Kingsbury, D.T., Helinski, D.R.:
Stimulation by cyclic adenosine monophosphate of plasmid deoxyribonucleic acid replication and catabolic repression of the plasmid deoxyribonucleic acid-protein relaxation complex.
J. Bacteriol. 114, 577-591 (1973)

Kastritsis, C.D., Grossfield, J.:
Balbiani rings in Drosophila auraria.
Dros. Inf. Serv. 47, 123-123 (1971)

Keyl, H.G.:
Untersuchungen am Karyotypus von Chironomus thummi. I. Karte der Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus thummi thummi und die cytologische Differenzierung der Subspezies Ch. th. thummi und Ch. th. piger.
Chromosoma 8, 739-756 (1957)

Keyl, H.G.:
Die cytologische Diagnostik der Chironomiden. III. Diagnose von Chironomus parathummi n. sp. und Ergänzungen zur Bestimmungstabelle.
Arch. Hydrobiol. 58, 1-6 (1961)

Keyl, H.G., Strenzke, K.:
Taxonomie und Cytologie von zwei Subspecies der Art Chironomus thummi.
Z. Naturforsch. 11b, 727-735 (1956)

Kunz, W., Glätzer, K.H.:
Similarities and differences in the gene structures of the three nucleoli of Drosophila hydei.
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 360, 313-313 (1979)

Lamb, M.M., Daneholt, B.:
Characterization of active transcription units in Balbiani rings of Chironomus tentans.
Cell 17, 835-848 (1979)

Lambert, B.:
Repeated DNA sequences in a Balbiani ring.
J. Mol. Biol. 72, 65-75 (1972)

Lambert, B., Wieslander, L., Daneholt, B., Egyházi, E., Ringborg, U.:
In situ demonstration of DNA hybridizing with chromosomal and nuclear sap RNA in Chironomus tentans.
J. Cell Biol. 53, 407-418 (1972)

Lambert, B., Beermann, W.:
Homology of Balbiani ring DNA in two closely related Chironomus species.
Chromosoma 51, 41-47 (1975)

Lis, J.T., Prestidge, L., Hogness, D.S.:
A novel arrangement of tandemly repeated genes at a major heat shock site in D. melanogaster.
Cell 14, 901-919 (1978)

Livak, K.J., Freund, R., Schweber, M., Wensink, P.C., Meselson, M.:
Sequence organization and transcription at two heat shock loci in Drosophila.
Proc. Nat. Acad. Sci. 75, 5613-5617 (1978)

Loening, U.E.:
The fractionation of high molecular weight ribonucleic acid in polyacrylamide gel electrophoresis.
Biochem. J. 102, 251-257 (1967)

Long, E.O., Dawid, I.B.:
Expression of ribosomal DNA insertions in Drosophila melanogaster.
Cell 18, 1185-1196 (1979)

Mandel, H., Higa, A.:
Calcium-dependent bacteriophage DNA infection.
J. Mol. Biol. 53, 159-162 (1970)

Maniatis, T., Jeffrey, A., van de Sande, H.:
Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis.
Biochemistry 14, 3787-3794 (1975)

Maniatis, T., Jeffrey, A., Kleid, D.G.:
Nucleotide sequence of the rightward operator of phage λ.
Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 1184-1188 (1975)

Manning, R.F., Gage, L.P.:
Physical map of the Bombyx mori DNA containing the gene for silk fibroin.
J. Biol. Chem. 253, 2044-2052 (1978)

Manning, R.F., Gage, L.P.:
Internal structure of the silk fibroin gene of Bombyx mori.
J. Biol. Chem. 255, 9451-9457 (1980)

Manning, R.F., Samols, D.R., Gage, L.P.:
The genes for 18S, 5.8S and 28S ribosomal RNA of Bombyx mori are organized into tandem repeats of uniform length.
Gene 4, 153-166 (1978)

Maxam, A.M., Gilbert, W.:
A new method for sequencing DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 560-564 (1977)

Meagher, R.B., Tait, R.C., Betlach, M., Boyer, H.W.:
Protein expression in E. coli minicells by recombinant plasmids.
Cell 10, 521-536 (1977)

Modrich , P., Lehman, I.R.:
Enzymatic joining of polynucleotides. IX. A simple and rapid assay of polynucleotide joining (ligase) activity by measurement of circle formation from linear deoxyadenylate-deoxythymidylate copolymer.
J. Biol. Chem. 245, 3626-3631 (1970)

Morrow, J.F., Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W., Goodman, H.M., Helling, R.B.:
Replication and transcription of eucaryotic DNA in Escherichia coli.
Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 1743-1747 (1974)

Ohshima, Y., Suzuki, Y.:
Cloning of the silk fibroin gene and its flanking sequences.
Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 5363-5367 (1977)

Palmiter, R.D.:
Magnesium precipitation of ribonucleoprotein complexes. Expedient techniques for the isolation of undegraded polysomes and messenger ribonucleic acid.
Biochemistry 13, 3606-3615 (1974)

Peacock, A.C., Dingman, C.W.:
Molecular wieght estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels.
Biochemistry 7, 668-674 (1968)

Pellegrini, M., Manning, J., Davidson, N.:
Sequence arrangement of the rDNA of Drosophila melanogaster.
Cell 10, 213-224 (1977)

Pelling, C.:
Ribonukleinsäure-Synthese der Riesenchromosomen. Autoradiographische Untersuchungen an Chironomus tentans.
Chromosoma 15, 71-122 (1964)

Pene, J.J., Knight, F., Darnell, J.E.:
Characterization of a new low molecular weight RNA in HeLa ribosomes.
J. Mol. Biol. 33, 609-623 (1968)

Perry, R.P.:
Processing of RNA.
Ann. Rev. Biochem. 45, 605-629 (1976)

Philippsen, P., Kramer, R.A., Davis, R.W.:
Cloning of the yeast ribosomal DNA repeat unit in SstI and HindIII lambda vectors using genetic and physical size selections.
J. Mol. Biol. 123, 371-386 (1978)

Polisky, B., Greene, P., Garfin, D.E., McCarthy, B.J., Goodman, H.M., Boyer, H.W.:
Specificity of substrate recognition by the EcoRI restriction endonuclease.
Proc. Nat. Acad.Sci. 72, 3310-3314 (1975)

Rae, P.M.M.:
Chromosomal distribution of rapidly reannealing DNA in Drosophila melanogaster.
Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 1018-1025 (1970)

Rae, P.M.M., Spear, B.B.:
Macronuclear DNA of the hypotrichous ciliate Oxytricha fallax.
Proc. Nat. Acad. Sci. 75, 4992-4996 (1978)

Rae, P.M.M., Barnett, T.R., Babbitt, D.G.:
Factors influencing the yield of satellite DNA in extractions from Drosophila virilis and Drosophila melanogaster adults and embryos.
Biochim. Biophys. Acta 432, 154-160 (1976)

Renkawitz, R., Gerbi, S.A., Glätzer, K.H.:
Ribosomal DNA of the fly Sciara coprophila has a very small and homogeneous repeat unit.
Molec. Gen. Genet. 173, 1-13 (1979)

Ribbert, D.:
Die Polytänchromosomen der Borstenbildungszellen von Calliphora erythrocephala unter besonderer Berücksichtigung der geschlechtsgebundenen Strukturheterozygotie und des Puffmusters während der Metamorphose.
Chromosoma 21, 296-344 (1967)

Ribbert, D.:
Chromomeres and puffing in experimentally induced polytene chromosomes of Calliphora erythrocephala.
Chromosoma 74, 269-298 (1979)

Rochaix, J.D., Malnoe, P.:
Anatomy of the chloroplast ribosomal DNA of Chlamydomonas reinhardii.
Cell 15, 661-670 (1978)

Rothfels, K.H.:
Black flies: Siblings, sex, and species grouping.
J. Hered. 47, 113-122 (1956)

Rubinstein, L., Clever, U.:
Non-conservative processing of ribosomal RNA in an insect, Chironomus tentans.
Biochim. Biophys. Acta 246, 517-529 (1971)

Rydlander,L., Edström, J.E.:
Large sized nascent protein as dominating component during protein synthesis in Chironomus salivary glands.
Chromosoma 81, 85-99 (1980)

Rydlander, L., Pigon, A., Edström, J.E.:
Sequences translated by Balbiani ring 75S RNA in vitro are present in giant secretory protein from Chironomus tentans.
Chromosoma 81, 101-113 (1980)

Sanders, J.P.M., Heyting, C., Verbeet, M.P., Meijlink, F., Borst, P.:
The organization of genes in yeast mitochondrial DNA. III. Comparison of the physical maps of the mitochondrial DNAs from three wild-type Saccharomyces strains.
Molec. Gen. Genet. 157, 239-261 (1977)

Santa-Cruz, M.C., Villanueva, A., Diez, J.L.:
Effect of galactose treatment in the puffing pattern of Chironomus thummi Balbiani rings.
Chromosoma 69, 93-100 (1978)

Serfling, E.:
Studies on the lability of Dipteran 28S ribosomal RNA: The formation of the breakpoint of 28S rRNA is a cytoplasmic event.
Biol. Zbl. 95, 713-723 (1976)

Serfling, E., Maximovsky, L., Wobus, U.:
Synthesis and processing of ribosomal ribonucleic acid in salivary gland cells of Chironomus thummi.
Eur. J. Biochem. 45, 277-289 (1974)

Shine, J., Dalgarno, L.:
Occurrence of heat-dissociable ribosomal RNA in insects: The presence of three polynucleotide chains in 26S RNA from cultured Aedes aegypti cells.
J. Mol. Biol. 75, 57-72 (1973)

Smith, D.J., Blattner, F.R., Davies, J.:
The isolation and partial characterization of a new restriction endonuclease from Providencia stuartii.
Nucl. Ac. Res. 3, 343-353 (1976)

Southern, E.M.:
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98, 501-517 (1975)

Stafford, D.W., Bieber, D.:
Concentration of DNA solutions by extraction with 2-butanol.
Biochim. Biophys. Acta 378, 18-21 (1975)

Strobel, E., Dunsmuir, P., Rubin, G.M.:
Polymorphisms in the chromosomal locations of elements of the 412, copia and 297 dispersed gene families in Drosophila.
Cell 17, 429-439 (1979)

Sussenbach, J.S., Monfoort, C.H., Schiphof, R., Stobberingh, E.E.:
A restriction endonuclease from Staphylococcus aureus.
Nucl. Ac. Res. 3, 3193-3202 (1976)

Sutcliffe, J.G.:
pBR322 restriction map derived from the DNA sequence: accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long.
Nucl. Ac. Res. 5, 2721-2728 (1978)

Sutcliffe, J.G.:
Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322.
Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 44, 77-90 (1979)

Suzuki, Y., Brown, D.D.:
Isolation and identification of the messenger RNA for silk fibroin in Bombyx mori.
J. Mol. Biol. 63, 409-429 (1972)

Tabak, H.F., Flavell, R.A.:
A method for the recovery of DNA from agarose gels.
Nucl. Ac. Res. 5, 2321-2332 (1978)

Tartof, K.D.:
Evolution of transcribed and spacer sequences in the ribosomal RNA genes of Drosophila.
Cell 17, 607-614 (1979)

Thuring, R.W.J., Sanders, J.P.M., Borst, P.:
A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels.
Anal. Biochem. 66, 213-220 (1975)

Trendelenburg, M.F., Spring, H., Scheer, U., Franke, W.W.:
Morphology of nucleolar cistrons in a plant cell, Acetabularia mediterranea.
Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 3626-3630 (1974)

Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J., Goodman, H.M.:
Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences.
Science 196, 1313-1318 (1977)

Wahl, G.M., Stern, M., Stark, G.R.:
Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate.
Proc. Nat. Acad. Sci. 76, 3683-3687 (1979)

Wellauer, P.K., Dawid, I.B.:
The structural organization of ribosomal DNA in Drosophila melanogaster.
Cell 10, 193-212 (1977)

Wellauer, P.K., Dawid, I.B., Brown, D.D., Reeder, R.H.:
The molecular basis for length heterogeneity in ribosomal DNA from Xenopus laevis.
J. Mol. Biol. 105, 461-486 (1976)

White, R.L., Hogness, D.S.:
R-loop mapping of the 18S and 28S sequences in the long and short repeating units of Drosophila melanogaster rDNA.
Cell 10, 177-192 (1977)

Wieslander, L.:
Number and structure of Balbiani ring 75S RNA transcription units in Chironomus tentans.
J. Mol. Biol. 134, 347-367 (1979)

Wild, M.A., Gall, J.G.:
An intervening sequence in the gene coding for 25S ribosomal RNA of Tetrahymena pigmentosa.
Cell 16, 565-573 (1979)

Wilson, G.A., Young, F.E.:
Isolation of a sequence specific endonuclease (BamI) from Bacillus amyloliquefaciens H.
J. Mol. Biol. 97, 123-125 (1975)

Wobus, U., Bäumlein, H., Panitz, R., Serfling, E., Kafatos, F.C.:
Periodicities and tandem repeats in a Balbiani ring gene.
Cell 22, 127-135 (1980)

L E B E N S L A U F

22.8.1949	geboren in Vordorf, Regierungsbezirk Oberfranken, Land Bayern
1955 - 1959	Besuch der Volksschule Egerstraße in Wunsiedel
1959 - 1960	Besuch der Friedrich Güll-Volksschule in Ansbach
1960 - 1969	Besuch des Mathematisch-Naturwissenschaftlichen und Neusprachlichen Gymnasiums für Mädchen in Ansbach. Reifeprüfung im Juni 1969
ab WS 1969/70	Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
SS 1971	Diplomvorprüfung in Biologie
WS 1973/74	Diplomprüfungen in Biologie
1.5.1974 - 21.1.1976	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Beermann, in Tübingen, unter Anleitung von Herrn Dr. C.P. Hollenberg
ab 1.2.1976	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Beermann, unter Anleitung von Herrn Dr. C.P. Hollenberg

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Bunke, L. Flohé, W. Frank, K.G. Grell, J. Guglielmi,
V. Hemleben, H. Jockusch, C. Jönsson, H. Krüger, R. Lorenz,
K. Mägdefrau, H. Meier, H. Metzner, G.F. Meyer, G. Mickoleit,
F.P. Möhres, E. Müller, H. Pape, C. Pelling, H. Probst,
W. Rähle, B. Röttger, W. Rüdorff, E. Sander, S. Sarkar,
V. Schwarz, W. Schweizer, B. Schwemmle, H. Seiler, W. Seyffert,
D. Sperlich, H. Stegmann, H. Suhr, G. Weitzel, U. Weser,
K. Wöhrmann, H. Zähner, K. Zetsche, W. Zimmermann.